

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FERNANDA MANCINI NAKAMURA

**Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos
isoladas de biocarvão de Terra Preta de Índio da Amazônia Central**

Piracicaba
2014

FERNANDA MANCINI NAKAMURA

**Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos
isoladas de biocarvão de Terra Preta de Índio da Amazônia Central**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientadora: Prof^a Dr^a Tsai Siu Mui

**Piracicaba
2014**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Nakamura, Fernanda Mancini

Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos isoladas de biocarvão de Terra Preta de Índio da Amazônia Central / Fernanda Mancini Nakamura; orientadora Tsai Siu Mui. - - Piracicaba, 2014.

128 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1 Biodegradação 2. Bioinformática 3. Biologia molecular 4. Carvão 5. Compostos aromáticos 6. Cultura de microorganismos 7. DNA 8. Ecologia microbiana 9. Fertilidade do solo I. Título

CDU 579.26 : 662.711

Dedico...

Aos meus pais Nilze e Rodolfo pela dedicação, pelo amor incondicional, pelas orientações, pelos bons exemplos e ensinamentos do que é caráter, idoneidade, da gratificação do trabalho árduo e como prosperar sem ultrapassar os limites da ética. Orgulho-me de ser quem sou e devo isso a vocês!

Agradeço...

Primeiramente a Deus, dentro da minha visão do significado.....

....À Profª Drª Siu Mui Tsai, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, minha primeira porta aberta que serei grata por todo sempre pela palavra incentivadora; pela generosidade; pela oportunidade de aprendizado e confiança e excelência no seu trabalho que permite a realização de pesquisas de alto nível em nosso País.

Ao amado Renan Antunes Donadelli pelo verdadeiro companheirismo pessoal e intelectual, pela sua disposição em me acompanhar nas madrugadas de leitura no ELISA, enfim, são tantas coisas que resumo em: agradeço por termos nos encontrado nesta vida!

...Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular Fábio Duarte, Francisco Montrazi (in memoriam), José Elias Gomes, Wagner Picinini e Ludmila Campos pela atenção e disposição para auxiliar, sem vocês nada seria possível.

Ao Profº Drº Adibe Luiz Abdalla, do Laboratório de Nutrição Animal pela confiança depositada e pelo imenso auxílio junto ao CENA/USP....

...À Rosineide Cardoso de Souza e ao técnico Sandoval do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela hospitalidade e imenso auxílio na campanha de campo que originou o material para este trabalho, imensa gratidão!

À Marília Henyei pelo auxílio na formatação e paciência; ao Fábio, Daiane, Sônia e Neuda pelos auxílios nos processos administrativos, sempre com serenidade e boa vontade que nos acalma nas horas de correria.

.....Às instituições Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”(ESALQ/USP) da Universidade de São Paulo (USP), pela excelência de ensino que me possibilitou alcançar o meu objetivo profissional inicial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa - FAPESP pelo auxílio crucial....

.....Aos colegas de pós-graduação do CENA Fabi Cannavan, Majú Brossi, Caio A. Yoshiura (Yóshi), Andressa M. Venturini, Aline G. da França, Tatiana Rosa, Bia e Clóvis Borges, Marina Dellias, Dennis Göes, Lucas W. Mendes, Marcela Arnaldo, Acácio A. Navarrete, Janne Louise e aos de Iniciação Científica João A. Cruz Lopes e Paula Cruz Lopes. Agradeço a todos pelo companheirismo, convívio harmônico, pela contribuição com suas experiências e/ou trabalho braçal (irmãos Lopes por terem acompanhado alguns dos momentos eternos da separação do carvão e outras análises) muito obrigada mesmo!!

Tudo isso nos impulsiona ao melhor e nos ajuda a ultrapassar barreiras tanto profissionais, quanto pessoais. E isso é subir na vida e se tornar alguém de valor. O resto é consequência!!

*“A good head and good heart are always a formidable combination
(...).”*

Nelson Mandela (1918-2013)

*“(...)Earning happiness means doing good and working, not
speculating and being lazy. Laziness may look inviting, but only work
gives you true satisfaction.”*

Anne Frank (1929-1945)

RESUMO

NAKAMURA, F. M. **Bioprospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos isoladas de biocarvão de Terra Preta de Índio da Amazônia Central**. 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Devido aos altos teores de húmus e matéria orgânica pirolisada, os solos de Terra Preta de Índio da Amazônia (TPA) apresentam uma dinâmica diferente de outros, com hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em grandes quantidades. Os alcanos são os maiores constituintes da matéria orgânica do solo, pouco reativos, insolúveis e recalcitrantes, promovendo menor rendimento à produção de combustíveis fósseis e renováveis. Os hidrocarbonetos aromáticos, assim como alcanos, são encontrados no ambiente de forma natural ou introduzidos e podem ser tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos. O estudo das comunidades bacterianas desses locais é de interesse no entendimento da alta fertilidade destes solos e da ação do carvão na relação planta-solo-microrganismo, além de bioprospecções de novas vias metabólicas. Diversos estudos já avaliaram genes de interesse para biodegradação destes compostos na TPA, como *bph* (Brossi, 2014) em solo e α -ARHDs (Germano, 2011) em solo e carvão, ambos para degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Porém o gene *alk*, para degradação de alcanos, ainda não fora estudado em carvão de TPA e nenhum isolamento bacteriano deste carvão foi feito e o presente trabalho teve esta abordagem inovadora para os solos de TPA, aliando cultivo, biologia molecular e bioensaios. O carvão foi separado, diluído e plaqueado em cinco meios de cultivo, com posterior incubação microaerofílica. Ao final da obtenção dos isolados, uma seleção de singularidade de morfologia foi feita a fim de se trabalhar com riqueza de tipos bacterianos, resultando em 86 isolados. Na identificação molecular pelo gene 16S ribossomal bacteriano identificamos 24 gêneros: *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Pantoea*, *Leclercia*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Parapusiliimonas*, *Bordetella*; *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Rummeliibacillus*; *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*; e *Fibrobacterium*, além de bactérias não cultivadas. Os meios GA e ES comprovaram ser um método com boa eficiência para isolamento de quantidade e variedade de bactérias do carvão, tanto aeróbias quanto anaeróbias facultativas, sendo pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. Apenas 11 isolados possuem o gene *alk*. Observamos que 53,49% de isolados foram positivos para a degradação de 0,05% de fenantreno; 70,93% foram positivos para a degradação de 8% de óleo diesel; e 88,37% foram positivos para degradação de 0,05% de bifenil. Houve isolados com capacidade de degradar mais de um substrato, e até mesmo os 3 substratos. Este estudo demonstra que os biocarvões de TPA são um microhabitat para microrganismos com capacidade comprovada em metabolizar hidrocarbonetos aromáticos complexos e diversos como fonte de carbono e energia. Os isolados apresentam um grande potencial biotecnológico para a geração de moléculas ligadas aos processos metabólicos da biodegradação, principalmente os não-cultivados, podendo auxiliar processos de biorremediação de áreas contaminadas e, possivelmente, produção de biocombustíveis de segunda geração. Além disso, os dados gerados por este estudo fornecem informações sobre o papel dessas bactérias na ciclagem de nutrientes, que influenciam diretamente na resiliência e fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia por serem capazes de degradar compostos recalcitrantes de carbono dos fragmentos de biocarvão, ácidos húmicos e, talvez, grupos funcionais aderidos, além de outras frações da matéria orgânica humificada.

Palavras-chave: Biodegradação. Cultivo de microrganismos. Ecologia microbiana. Biologia molecular

ABSTRACT

NAKAMURA, F. M. **Bioprospection of bacterial degraders of aromatic hydrocarbons isolated from biochar of Amazonian Dark Earths from Central Amazon**. 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Due to high humus content and pyrolyzed organic matter, Amazonian Dark Earth Soils (ADE) show different dynamic than other soils, presenting high contents of aliphatic and aromatic hydrocarbons. Alkanes are the major constituents of soil organic matter, low reactive, insoluble and recalcitrant, promoting lesser yield on fossil and renewable fuels production, as well as pollute the environment when in high concentrations. Aromatic hydrocarbons, as well as alkanes, are found in environment due to natural e industrial processes, are insoluble and recalcitrants, and can be toxic, mutagenic and carcinogenic. The study of bacterial communities from these areas is of major interest to reveal the high fertility of these soils, and understand the biochar influences on the plant-soil-microorganism relation, besides discover novel bacteria, genes and proteins. Diverse studies had already evaluated genes of interest for the biodegradation of hydrocarbons on ADEs, like *bph* gene (Brossi, 2014) from soils and α -ARHDs (Germano, 2011) from soils and biochar. However, the *alk* gene for the biodegradation of alkanes was never studied in biochar. Neither any bacterial isolation from the ADEs biochar was done until now, so this work has this innovative approach to the ADEs. Biochar was separated, diluted and plated on five culture media, and microaerophilic incubation. The isolates were selected by their morphology and 86 isolates were obtained. We identified 24 bacterial genera through the 16S rRNA gene sequencing: *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Pantoea*, *Leclercia*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Parapusiliimonas*, *Bordetella*; *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Rummeliibacillus*; *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*; and *Fibrobacterium*, in addition to uncultured-bacteria. GA and ES media were the best on variety and number of bacteria from biochar, such aerobic as well as facultative anaerobic bacteria, being from the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The *alk* gene was found in 11 isolates. We observed 53,49% of isolates were positive for 0,05% phenanthrene degradation; 70,93% of isolates were positive for 8% diesel oil degradation; and 88,37% of isolates were positive for 0,05% biphenyl degradation. There were isolates capable to degrade more than one substratum, even the three substrata. This study demonstrates that ADE biochars are a microhabitat for bacteria with proved capacity to metabolize complex aromatic hydrocarbons as carbon and energy sources. The isolates have great biotechnological potential to generate molecules associated to metabolic process of biodegradation, mainly the uncultured ones, being helpful for polluted areas bioremediation and, possibly, to the production of second generation biofuels. Furthermore, the generated data supplies the role of bacteria from ADE biochar on the nutrient cycle, which directly influences the resilience and fertility of ADEs, for microbiota being capable to degrade recalcitrant carbon fragments of biochar, humic acids and, possibly, adhered functional groups, besides other organic matter fractions, as well.

Keywords: Biodegradation. Microorganisms culture. Microbial ecology. Molecular biology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
AIA	meio Actinomycetes Isolation Agar
BHI	meio Brain-Heart Infusion
µg	Micrograma
µL	Microlitro
cm	Centímetro
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTPs	Deoxiribonucleosídeo Trifosfato
DCPIP	Diclorofenol-2,6-indofenol
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetrecético
ES	meio Extrato de solo de TPA
g	Grama
GA	meio de Wageningen
ISPnap	Proteína ferro-sulfúrica
m	Metro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mm	Milímetro
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PCB	“Polychlorinated Biphenyl” (Bifenil policlorados)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomoles
RNA	“Ribonucleic Acid” (Ácido Ribonucléico)
RNAse	Ribonuclease
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
rpm	Rotações por minuto
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
THG	Transferência horizontal de genes
TPA	Terra Preta de Índio da Amazônia
TSA	meio Trypticase Soy Agar
Tris	Tris – (hidroximetil)-aminometano
UV	Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Solos	19
2.2. Os Sítios De Terra Preta De Índio Da Amazônia (Tpa).....	19
2.2.1. Fertilidade Das Tpas.....	23
2.2.2. As Áreas De Estudo	25
2.2.2.1. Sítio Costa Do Açutuba (Açu).....	26
2.2.2.2. Sítio Hatahara (Hat).....	26
2.2.2.3. Sítio Laguinho (L)	27
2.2.2.4. Sítio Lago Grande (Lg)	27
2.2.2.5. Sítio Barroso (Bar)	28
2.3. Compostos Dos Solos.....	28
2.3.1. Matéria Orgânica Do Solo (Mos).....	28
2.2.3. Biocarvão	32
2.4. Diversidade Microbiana Dos Solos De Terra Preta De Índio	36
2.4.1. Diversidade Microbiana No Carvão.....	37
2.5. Biodegradação De Hidrocarbonetos.....	38
2.5.1. Biodegradação De Hidrocarbonetos Saturados (N-Alcanos).....	40
2.5.2. Biodegradação De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	41
2.5.2.1. Biodegradação De Bifenil	45
2.5.3.1. Lingnocelulose	47
2.5.3.1.1. Biodegradação De Celulose E Hemicelulose.....	47
2.5.3.1.2. Biodegradação De Lignina.....	48
2.5.3.2. Biodegradação De Petróleo	51
2.5.3.3. Biodegradação De Óleo Diesel	52
2.5.4. Bioensaios De Degradação.....	52
2.5.5. Técnicas Moleculares	53
2.5.5.1. Identificação Molecular De Isolados Bacterianos.....	54
2.5.5.1.1. Análises Filogenéticas E Sequências De 16s Rna	54
2.5.5.2. Estudos Moleculares Das Bactérias Dos Solos De Tpa Da Amazônia e Adjacências	54
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivos Gerais	56
3.2. Objetivos Específicos.....	56
4. METODOLOGIA	57
4.1. Local De Coleta.....	57
4.2. Análises Físicas E Químicas Do Solo	58
4.3. Separação Do Carvão	59
4.4.1. Meios De Cultura Sólido Para Isolamento Em Placa.....	60
4.4.2. Incubação	62
4.4.3. Extração De Dna Dos Isolados Do Carvão	63

4.4.4. Amplificação Do Gene 16s Rrna De BacteriaE Genes Alkb/Alkm E BphPara Sequenciamento.....	64
4.4.4.1.Reação De Sequenciamento Dos Genes 16s Rrna, Alkm E Alkb E Bph.....	65
4.4.4.2.Construção De Árvores Filogenéticas	66
4.5.Bioensaio De Degradação De N-Alcanos E Hidrocarbonetos Aromáticos.....	68
4.5.2. Pré-Teste De Padrões, Concentrações E Co-Fator	70
4.5.3. Teste De Biodegradação Com Os Isolados	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1. Análises Físicas E Químicas Do Solo	72
5.2.Isolamento Bacteriano, Extração De Dna, Amplificação Gene 16s Rrna, Alk E Bph, Sequenciamento E Identificação	74
5.2.1.Análise Filogenética Gene 16s Rrna	79
5.2.2.Amplificação Do Gene Alk E Bph, Sequenciamento E Identificação	83
5.3.Bioensaio De Degradação De N-Alcanos E Hidrocarbonetos Aromáticos.....	88
6.CONCLUSÕES.....	102
7. PERSPECTIVAS.....	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXOS.....	124

1. INTRODUÇÃO

Nos trópicos úmidos, como na Amazônia, intensas condições climáticas levam à formação de solos altamente lixiviados (LEHMANN et al., 2003). Porém, as Terras Pretas de Índio da Amazônia (TPA), situadas em áreas adjacentes a cursos d'água da Bacia Amazônica, têm propriedades de fertilidade únicas nos trópicos úmidos, sendo muito utilizadas pelas comunidades locais e alvo de comércio, não ideal por serem patrimônio histórico do Brasil (IPHAN, 1988). Sua fertilidade se deve, dentre outros fatores, à alta concentração de matéria orgânica do solo (MOS), que se resume a uma complexa miscelânea de compostos orgânicos oriundos de plantas e animais em diferentes estágios de decomposição, e aos altos teores de biocarvão.

A matéria orgânica do solo humificada, apesar de mais recalcitrante pela presença de hidrocarbonetos aromáticos e alcanos, é ao mesmo tempo reativa por ser degradada por alguns microrganismos. O biocarvão parece ser um agente tampão atuando fortemente na resiliência destes solos pela capacidade de estabilizar a matéria orgânica (SOMBROEK et al., 2003). Sua formação de carbono e sua estrutura porosa podem diminuir a densidade do solo, melhorando a retenção de umidade e aumentando o pH; em seu interior. Ainda, o biocarvão pode reter gases, umidade e abrigar microrganismos (BRADY; WEIL, 2008) e ser uma fonte de carbono a esses microrganismos (STEINER et al., 2008). Desta forma são um microhabitat em meio aos solos de TPA para microrganismos com funções na ciclagem de nutrientes de alto interesse à bioprospecção. Outro aspecto seria que o alto teor de biocarvões, juntamente com os ácidos húmicos do solo, possuem propriedades de carga na sua superfície que possibilitam um ambiente favorável às reações de troca catiônica, com colóides inorgânicos e orgânicos do solo, e de complexação de cátions metálicos, entre outras (SOHI et al., 2010) reduzindo, assim, a lixiviação de nutrientes (GLASER et al., 2002). Assim, a alta quantidade de matéria orgânica e biocarvão dos solos antrópicos da Amazônia tem um papel chave em relação às suas propriedades e funções sobre diversos processos que compõem o sistema solo-planta-microrganismo devido às suas distintas propriedades físico-químicas.

Entretanto, é ainda desconhecido o efeito direto do biocarvão e cinzas deste, que ajudam a compor a MOS nos processos biológicos de acumulação de carbono no solo. São também desconhecidos os mecanismos de ação do biocarvão sobre a microbiota autóctone e do solo; e sobre o crescimento as plantas.

As moléculas orgânicas recalcitrantes podem ser naturais ou sintéticas, oriundas dos processos industriais. Algumas dessas moléculas são muito tóxicas aos seres vivos, podem causar mutações no código genético, eliminando indivíduos ou selecionando os mais adaptados, interferindo diretamente no equilíbrio natural do ambiente. Com base na sua abundância e toxicidade, os compostos aromáticos e alcanos têm sido considerados

prioritários na busca por soluções de descontaminação. O tratamento biológico de solos contaminados com hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e de alcanos nas indústrias petroleiras parece ser uma via eficiente, econômica e versátil em alternativa ao tratamento físico-químico, porque oferece vantagens potenciais como a destruição completa do poluente, baixo custo, grande segurança e menos perturbação ambiental.

Nesse sentido, muitas pesquisas atualmente têm seu foco na degradação biológica destes hidrocarbonetos via metabolismo e cometabolismo. As alcano hidrolases são enzimas que atuam em uma etapa da degradação de alcanos e vêm sendo muito estudadas com base nos genes *alkB* e *alkM* em bactérias. As dioxigenases aromáticas (ARHD) têm sido descritas como enzimas responsáveis pela catálise de reações de oxidação de polienos conjugados (BOYD et al., 2001), ou HPAs, sendo muito estudados através de prospecções do gene da subunidade α -ARHD.

O estudo dos genes análogos (genes de linhagens evolutivas distantes com a mesma função de codificação) e homólogos (genes com sequências semelhantes codificam para proteínas de diferentes especificidades) envolvidos na síntese de enzimas degradadoras de hidrocarbonetos saturados e aromáticos, juntamente com estudos sobre diversidade genética destas estirpes, poderão informar sobre o comportamento destes microrganismos em condições ambientais extremas.

A busca por organismos não identificados e não cultivados é necessária para ampliar a aplicação na biotecnologia, bem como entender como esses microrganismos são capazes de utilizar os compostos por meio da ação de suas enzimas (GAYLARDE et al., 2005).

Muitos pesquisadores encontraram bactérias de interesse agrícola e biotecnológico nos solos de TPA e no carvão, sendo que neste último, os filos representativos foram *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* (GERMANO, 2011; CANNAVAN, 2011).

Ao serem reveladas as funções de cada gene quanto à especificidade a um substrato, através do estudo da síntese de genes envolvidos em vias degradadoras, permitirá estudos sobre a significância ecológica dessas populações e sobre a transferência gênica horizontal de genes. Essa transferência gênica horizontal pode ocorrer intra e interespécies (ou até entre gêneros distintos), agindo como promotor da seleção adaptativa perante cada ambiente, refletindo o ilimitado poder da bioquímica microbiana em solos tropicais.

Deste modo, as informações gênicas servirão também à taxonomia e ecologia microbiana, facilitando a compreensão das bases adaptativas dos microrganismos do biocarvão e seu papel no equilíbrio da fertilidade das TPA, além de determinar sua influência nos atributos biológicos destes solos antrópicos, tão favoráveis à agricultura sustentável na região amazônica.

Assim, estudos incluindo o uso de técnicas moleculares para avaliar a presença de genes funcionais envolvidos em atividades metabólicas e nos ciclos biogeoquímicos, como as dioxigenases aromáticas e alcano oxigenases, e ao mesmo tempo, aliados a estudos práticos de cultivo e bioensaios, permitem acessar mais detalhadamente a diversidade microbiana de sistemas biológicos.

Tais informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de sistemas sustentáveis de manejo da fertilidade em áreas de TPA degradada e para condicionamento de outros solos, em benefício dos pequenos agricultores e comunidades locais na Amazônia e de outros locais. Além de favorecer a compreensão das bases evolutivas da variabilidade genética da microbiota do biocarvão e prover dados que poderão servir como base para estudos de bioprospecção de genes de interesse comercial, como produtos da indústria farmacêutica, de combustíveis e, principalmente, daqueles envolvidos em processos de biorremediação de ambientes contaminados.

O presente trabalho é uma abordagem inédita aos solos de TPA que objetivou isolar bactérias do biocarvão para avaliar o método de isolamento por microaerofilia e a capacidade dos fragmentos de carvão serem uma fonte de novos tipos de bactéria e, também, de novas vias metabólicas relacionadas à biodegradação de compostos de carbono.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Solos

O solo é uma transformação das rochas matrizes locais resultantes de processos causados por intemperismo químico e físico e antrópico, os quais originam uma camada de superfície inconsolidada que recobre as rochas com materiais minerais e orgânicos (VIEIRA, 1988). É o material que cobre a maior parte da crosta terrestre e reflete a influência do clima, da topografia, do tempo, da flora, fauna e do homem (FAO, 2001).

As características do solo influenciam a vida que nele está, que por sua vez, influencia na qualidade do solo. A variação de silte, argila e areia determina o tipo de textura do solo. O calibre dos grãos é determinado pela mucilagem sintetizada por microrganismos (fungos e bactérias), o que influencia na percolação da água e nutrientes que influenciam na fertilidade do solo permitindo a germinação e manutenção da vegetação. Esta, juntamente com os microrganismos, meso e macro-fauna do solo acabam por influenciar na manutenção da estrutura do solo, na captação de nutrientes do ar e dos componentes do solo, permitindo a ciclagem e renovação dos nutrientes e gases.

2.2. Os sítios de Terra Preta de Índio da Amazônia (TPA)

A Terra Preta de Índio da Amazônia (TPA) foi primeiramente descrita por Hartt (1885) e depois Kern e Costa (1997). Estes solos negros são próprios de assentamentos antigos, muito conhecidos pela arqueologia. Esta começou a estudar a região amazônica a partir dos anos 60 concomitantemente a etnobotânicos, geógrafos e cientistas do solo. Somente a partir de 1980 a pesquisa na Terra Preta tornou-se interdisciplinar e multidisciplinar e hoje os locais são sítios arqueológicos, em que além do interesse pela história humana, há o interesse científico pela sua biologia. As manchas de TPA estão sob proteção do Instituto do Patrimônio Histórico Artístico Nacional (IPHAN, 1988) e sob estudos do Centro de Arqueologia dos Biomas da Amazônia (CABA) e muitos outros institutos e universidades brasileiros e internacionais.

Sítios de Terra Preta da Amazônia podem ser líticos ou cerâmicos e têm como principal característica a presença de solos escuros e férteis, que com ampla distribuição na América do Sul, se estendem desde os Andes até a Ilha de Marajó, abrangendo o Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela (SOMBROEK, 1966). Apesar de haver conhecimento de muitos sítios arqueológicos, não se tem um mapeamento de todas as ocorrências de TPA no território Amazônico.

O processo de formação das TPAs está associado a um terceiro momento de pedogênese, quando o material inconsolidado é novamente modificado. É, portanto, um solo

de pedogênese antrópica formado pelo manejo de restos orgânicos – folhas, sementes, cascas de árvores, ossos, sangue, fezes, conchas –, do fogo e cerâmica pelas populações pré-colombianas que habitaram a Floresta Amazônica nos terraços próximos às margens de baías, rios e igarapés. Os habitantes traziam e processavam o alimento perto das casas por meio de combustão de material vegetal para o cozimento de alimentos, além da fabricação de louças de cerâmica muito utilizadas e ornadas que refletem a época em que foram feitas. Estes restos orgânicos foram ao longo dos anos sendo alterados pelas ações abióticas e pela macro, meso e microfauna, alterando a composição química e coloração do solo. Como etapa final, deu-se a ação dos microrganismos e formou-se um material orgânico estável que promove um efeito tampão, permitindo alta resiliência do solo (WOODS, 2003).

Porém, sua formação não ocorreu de forma contínua (PETERSEN et al., 2005) entre 300 AC ao século XVI DC, havendo uma rápida formação entre os séculos V e XI DC (NEVES et al., 2003), que indicam terem ocorrido diversas fases de ocupação. Meggers já havia atribuído o abandono dos assentamentos pelas tribos indígenas à baixa fertilidade do solo depois de longos períodos de uso (MEGGERS, 1954) e às mudanças no clima ocasionadas pelo El Niño nos últimos 5000 anos (MEGGERS, 1995). Outro motivo que viria aumentar a pressão de deixar a área seria a existência de conflitos entre tribos da região pela posse da área ou pela dissipação das tribos em grupos menores, agora centrados na família nuclear e baseados na produção autônoma (NEVES et al., 2004).

Em relação à sua origem antrópica no acúmulo de dejetos e cinzas, se assemelha à Terra Preta Australis dos aborígenes da Austrália (DOWNIE et al., 2011) e terras pretas dos celtas e romanos que cobrem a Inglaterra e Suécia (SHAW, 2009). Em relação à ocupação humana nas terras amazônicas na era pré-colonial, Lima et al. (2005) como também Petersen et al. (2005) detalham as diferentes fases de ocupação segundo a arqueologia. A Fase Açutuba refere-se à datação de cerâmicas de 300 AC a 360 DC, quando começaram as mudanças gradativas na paisagem com construções de montículos, aterros, valas defensivas e paliçadas (PETERSEN et al., 2005). A Fase Manacapuru refere-se aos 500 DC a 900 DC, época de intensificação da exploração dos recursos naturais e mudança na paisagem. A Fase Paredão de 700 DC a 1200 DC refere-se às intervenções mais intensas na paisagem. A última é a Fase Guarita dos séculos IX ao XVI (NEVES, 2004; PETERSEN et al., 2005).

Os solos de TPA encontram-se sob a forma de manchas de diferentes tamanhos, ocupando áreas em torno de 0,5 a 3 hectares e de 30cm a 2m de profundidade (SMITH, 1980). A estimativa da dimensão total é de 0,1 a 0,3% (15.500-20.700 m²) da área florestada da Amazônia (SOMBROEK et al., 2003), porém há estimativas que chegam a 10%.

De modo geral, as manchas de TPA não são homogêneas, apresentando diferenças quanto à fertilidade. Porém algumas características importantes à fertilidade do solo são comuns à maioria das manchas até agora estudadas, como o alto teor de biocarbão detentores

de propriedades físico-químicas particulares e elevada concentração de estruturas poliaromáticas, além de elevados teores de nutrientes quando comparadas aos solos adjacentes (LEHMANN et al., 2003). Atualmente são classificadas tecnicamente como Latossolo ou Argissolo Amarelo Coeso Antrópico.

A coloração do solo das TPAs é negra, cinza, marrom e amarela, como resultado da mistura de matéria orgânica em vários estágios de decomposição; restos de carvão com cinzas e carbonato de cálcio; acúmulo de ferro próximo a fontes de calor; e acúmulo de ferro, respectivamente (WOODS, 2003). Rebellato (2007) em seu trabalho de descrição do sítio arqueológico do Hatahara, Iranduba-AM, caracterizou o perfil dos solos de TPA que são geralmente compostos por horizonte O, horizonte A e seus subhorizontes, horizonte AB, horizonte B e subhorizontes, horizonte C e o R:

- O: formado de matéria orgânica fresca na superfície, ou em vários estágios de decomposição nas camadas inferiores, de fermentação e humificação. Pedacos de cerâmica são muitas vezes visíveis neste horizonte.
- A: horizonte negro onde há a máxima atividade microbológica e varia de profundidade podendo ultrapassar os 100cm (ZECH et al.,1990) e é composto por um ou mais subhorizontes. Possui muitos fragmentos em cerâmica e contém alta concentração de matéria orgânica decomposta, matéria orgânica carbonizada (carvão), de minerais residuais e pouca concentração de argila mineral, ferro e alumínio. Rebellato (2007) explica que estes componentes foram lixiviados para as camadas inferiores devido a estas tenderem a ser mais porosas. Cerca de 50% dos sítios de terras pretas do Pará tem na profundidade de 30-60 cm um horizonte A de coloração negra que varia de N2, 10YR 2/1, 10YR 3/1, 5YR 2/1, 7,5YR 3/1 da Tabela Munsell (REBELLATO, 2007).
- B: horizonte que possui menos fragmentos de cerâmica e é de coloração mais clara com acumulação de argila, ferro, alumínio e matéria orgânica, sendo dito por Vieira (1988) como um solo de iluviação, o qual recebe componentes do solo eluvial.
 - A mudança do horizonte A para o B não é nítida, somente se percebe uma diminuição na quantidade de fragmentos de cerâmica, sendo nomeada esta transição de horizonte AB por Kämpf (2003). E a esta transição dos horizontes A e AB, Kämpf (2003) denomina de horizonte arqueo-antropogênico. Ainda existem os horizontes C, formado de material parental inconsolidado do qual se formou o solo, quase sem influência biológica.,
- R: é a rocha inalterada que representa a provável matriz do solo (REBELLATO, 2007).

No perfil do solo pode-se observar manchas nas camadas homogêneas, o que indica atividade biológica de raízes e mesofauna, além e abióticos pelo intemperismo. Podendo ser

resultado, também, de atividade humana que ao adicionar matéria orgânica por meio de descarte de dejetos de unidades domésticas, ou ao irrigar o solo, provoca tais alterações no perfil do solo. Solos com este histórico e semelhante fertilidade como a TPA acontecem em muitos ao redor do mundo e são determinados na FAO (2001) em outros locais por *Plaggeon soil*, *Paddy soil* e *Oasis soils* (REBELLATO, 2007).

Rebellato (2007) explica também que as diferenças em profundidade dos horizontes e a porosidade do solo diferem entre os sítios devido ao tempo de formação das TPAs e ao tipo de solo parental que originou os solos da Amazônia, que são identificados segundo os sistemas de classificação em:

- Ferralsols e Oxisols (VIEIRA, 1988) do Sistema Internacional WRB (FAO, 1998) e Sistema Americano (USDA, 2006), respectivamente, que coincidem com Latossolos do sistema brasileiro SIBCS (Embrapa, 2013);
- Como também o indicado por Kern et al. (2003) que segundo o SIBCS (Embrapa, 2013), os solos originais da Amazônia classificam-se como Espodossolos, os Spodosols segundo a Soil Taxonomy, ou Podzols segundo a WRB/FAO; Argissolos, os Acrisols segundo a WRB/FAO; Luvisolos, os Luvisols segundo a WRB/FAO; Neossolos, os Fluvisols e Arenosols segundo a WRB/FAO; Nitossolos, os Nitisols segundo a WRB/FAO; Cambissolos, os Cambisols segundo a WRB/FAO.

Ao redor das manchas de terra preta é frequente a existência de faixas de solo que variam do marrom ao preto com poucos artefatos cerâmicos, ou até ausência. Estes solos são chamados de Terras Mulatas e sua gênese é atribuída a intensa atividade agrícola no passado e até deposição intencional de resíduos orgânicos (SOMBROEK ¹ et al., 2002, apud REBELLATO, 2007). Segundo Hecht (2003), ocorria o processo de queima fria para produção agrícola, em que eram queimados à baixa temperatura folhas e troncos gerando carvão e nutrientes para o solo.

Estima-se que 1 cm de TPA leve pelo menos 10 anos para se formar, sendo um processo lento de decomposição e estruturação. No chernozem do nordeste da China, por exemplo, estimam que leve cerca de 100 anos para que 1,5 cm deste solo se regenere e cerca de mil anos para recuperar a área degradada pela utilização excessiva de fertilizantes e pesticidas (The EpochTimes, 2012).

Sobre essas terras, no Brasil, estão florestas nativas e secundárias médias (capoeira), florestas perturbadas (desmatadas), áreas cultivadas majoritariamente por agricultura de

¹SOMBROEK, W.; KERN, D.; RODRIGUES, T.; CRAVO, M.; JARBAS, T.; WOODS, W.; GLASER, B. **Terra Preta and Terra Mulata: pré-columbian Amazon Kitchen and agricultural fields, their sustainability and their replication.** 17° WCSS, Tailand, 2002.

subsistência com produções de milho, mamão, melancia, feijão, hortaliças, cana-de-açúcar e outras com pastagem.



Figura 1 -Distribuição das TPAs



Figura 2 -Perfil do solo de TPA

2.2.1. Fertilidade das TPAs

As TPAs desempenham grande papel na produção agrícola da região amazônica que sustenta alta produtividade por longos anos, resistência à lixiviação e ausência ou baixo uso de insumos, diferentemente das culturas nos solos adjacentes às TPAs (GERMANO, 2011) e terras mulatas. Assim, devido às suas propriedades, as TPAs são consideradas um dos solos mais férteis do mundo, a par do chernozem da Rússia, Ucrânia, Bulgária e Romênia, como também em regiões da Hungria, Polônia, China, Canadá e Estados Unidos.

Os pesquisadores atribuem sua alta fertilidade às elevadas concentrações de nutrientes para as plantas como potássio, fósforo, cálcio, nitrogênio, e carbono, aliado à retenção de umidade e concentração de matéria orgânica (GLASER, 1999) em vários estágios de decomposição, inclusive parcialmente queimada na forma de carvão. Além do alto teor de matéria orgânica, pesquisas têm mostrado que a composição da matéria orgânica em Terras Pretas também contribuem para o aumento do grau de fertilidade desses solos (TEIXEIRA et al., 2009). Além das frações estáveis das substâncias húmicas (SH) e biocarvão (SOMBROEK, 1966; KERN, KAMPF, 1989; LEHMAN et al., 2002) que controlam o pH entre 5 e 7, a maior saturação por bases e o menor teor de alumínio trocável também são evidenciados. Além disso, o fogo age nas estruturas do solo ao favorecer a agregação de partículas de areia, argila e biocarvão, o que dificulta a lixiviação dos nutrientes do solo (TEIXEIRA; MARTINS, 2003).

Há presença de três vezes mais matéria orgânica (MO), 70 vezes mais biocarvão e ácidos húmicos e uma diversidade microbiana maior em TPA em comparação aos seus solos adjacentes. Estudos de Cunha e colaboradores (2007) indicam que na profundidade de 0-20cm dos solos de TPA e adjacentes, há maior concentração de carbono total em TPA nativa e

perturbada, sendo corroborado por outros estudos (SOMBROEK, 1966.; SMITH, 1980; KERN; KÄMPF, 1989). A alta concentração de MO nos solos de TPA, mesmo com a alta decomposição deste habitat tropical, pode ser devido à formação de complexos estabilizados de MO-cálcio (CUNHA, 2005), altas concentrações de MO natural e carbonizada decomposta em substâncias húmicas (SH) e os fragmentos de biocarvão (GLASER, 2000), porções de C recalcitrante.

Em TPA, a maior fração da SH é composta por humina (H) (CUNHA, 2005). Lima (2001) e Souza et al. (2003) também verificaram que nestes solos há uma predominância das frações mais estáveis, os ácidos húmicos (AH) e H com menor contribuição das frações mais solúveis e móveis (AF – ácidos fúlvicos). Isso é resultado de intensa humificação e rápida mineralização de grandes quantidades de material orgânico rico em N, P e Ca incorporado ao solo (ZECH et al., 1990), possibilitado pelas condições ótimas de temperatura, precipitação elevada, drenagem adequada e caráter eutrófico desses solos. É o oposto ao que acontece nos demais solos de terra firme e várzea da Amazônia, os adjacentes.

Os solos adjacentes são latossolos amarelos, argissolos, espodossolos, dentre outros (como supracitado no item 2.2), e representam cerca de 74,7% da Amazônia, sendo considerados solos pobres em nutrientes, com alto teor de acidez, baixa capacidade de troca de cátions (VIEIRA, SANTOS, 1987), com alto grau de intemperização e lixiviação (VIEIRA, 1988; ZECH, 1997), o que promove um fator limitante para a produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola.

Como já dito, o carbono orgânico das TPAs está sob as formas de MO em vários estágios de decomposição e biocarvão. Este chega a apenas 14% nos solos adjacentes, diferentemente dos 35-45% dos solos de TPA, sendo estes solos ricos em estruturas aromáticas (ZECH et al., 1990). As estruturas aromáticas policíclicas são típicas do carbono formado por uma determinada combustão, a pirólise (KRAMER et al., 2004). Além disso, existe uma enorme gama de origens de hidrocarbonetos saturados (os alcanos) nas florestas amazônicas, a ser explicado no item 2.5.1.

Este biocarvão possui estabilidade química devido às suas estruturas aromáticas complexas, sendo muito mais resistente às degradações abióticas e microbiológicas (REBELLATO, 2007), armazenando carbono no solo por mais tempo. Além disso, sendo os fragmentos de biocarvão uma estrutura particulada, protegida e em complexos organo-minerais, esses favorecem as propriedades físicas dos solos de TPA na estruturação dos aglomerados, retenção de água (GOLCHIN et al., 1997) e servem até como microhabitat para microrganismos (STEINER et al., 2008), acabando por afetar positivamente a fertilidade.

Existe vasta população bacteriana capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos (GERMANO et al., 2012), além disso, os fragmentos de biocarvão podem acolher microrganismos com ação degradativa de outras formas de carbono e até com ação promotora

de crescimento das plantas como a alta proporção de actinobactérias encontrada em fragmentos de biocarvão no estudo de Cannavan (2011). Assim, o biocarvão é um fator chave na manutenção da fertilidade dos solos de TPA (GLASER et al., 2001).

Na literatura há a relação do biocarvão com substâncias húmicas (SH) e fertilidade do solo em TPAs, em que estão fortemente relacionadas às características moleculares das SH provenientes de MO carbonizada, das quais a fração de ácidos húmicos (AH) apresenta maior grau de humificação em relação a outros solos. De acordo com Stevenson (1994), quanto maior o estágio de humificação das substâncias húmicas (SH), maior é o teor de C e menor o de H (razão H/C menor). Em resumo, os AH pertencentes a solos antropogênicos são potencialmente mais reativos, o que favorece as reações de troca iônica, reações com colóides minerais do solo, reações de complexão com cátions metálicos e maior contribuição às reações dos ciclos biogeoquímicos (LIMA, 2001).

Em solos brasileiros, a matéria orgânica pode contribuir para até 80% das cargas negativas do solo, e isso explica o fato de a CTC estar geralmente associada à matéria orgânica do solo. A presença da fração ácidos húmicos (AH) tem sido relacionada a solos férteis, com alto conteúdo de bases trocáveis (CANELLAS et al., 2003), um dos aspectos que influenciam positivamente na fertilidade do solo.

2.2.2. As áreas de estudo

Foram estudados 5 sítios de Terra Preta no município de Iranduba - AM, com o mesmo tipo de tratamento, a floresta secundária média dita como capoeira: Laguinho (L), Barroso (Bar), Lago Grande (LG), Costa do Açutuba (Açu) e o Hatahara (Hat). Além disso, mais duas coberturas vegetais foram estudadas no Hatahara: canavial e pastagem.

Os cinco sítios estudados neste trabalho são sítios cerâmicos, todos localizados no município de Iranduba, AM, nos quais foi nítida a presença de fragmentos de cerâmica sobre e sob o solo escavado. A profundidade que o presente estudo explorou foi a de 0-30cm, que consiste nos horizontes A e AB, diferindo entre os sítios, com variação de coloração entre três tons da tabela de Munsell: 10YR 2/1 (BLACK); 10YR 3/1 (Very Dark Gray); 10YR 3/2 (Very Dark Graysh Brown) (REBELLATO, 2007). Em cada sítio foram encontrados diferentes usos do solo, sendo que a cobertura vegetal comum a todos os locais é a capoeira, como está ilustrado na Tabela 1. Exceto o Barroso, todas as áreas já foram estudadas pelo Centro de Arqueologia dos Biomas da Amazônia (CABA), que disponibilizam mapas detalhados da topografia e localização das manchas de terra preta.

Tabela 1 - Relação das áreas estudadas e suas características. (Nakamura, F.M.)

Uso terra/área	Hatahara	Açutuba	Laguinho	Lago grande	Barroso
Abandono da área	12 anos	10 anos	20 anos	20 anos	40 anos
Estudado CABA	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Profundidade TPA	>100cm	>20cm	15cm	20cm	20cm
Capoeira	X	X	X	X	X
Floresta secundária	-	-	-	X	X
Cana	X	-	-	-	-
Pastagem	X	-	-	-	-
Mamão	-	X	X	-	-
Hortaliças	-	X	-	-	X
Mandioca	-	X	-	-	-
Melancia	-	-	-	X	-
Citros	-	-	X	-	-
Banana	X	-	-	-	X

2.2.2.1. Sítio Costa do Açutuba (Açu)

O sítio Costa do Açutuba está localizado no município de Iranduba - AM, Brasil, nas coordenadas 03°05.829'S 60°21.340'O, na margem direita do rio Negro. Possui aproximadamente 90 ha de área e foi ocupado em pelo menos quatro episódios distintos desde o mais antigo relatado na região amazônica de 300 AC na Fase Açutuba, passando pela Fase Manacapuru (século IV ao século IX DC), a Fase Paredão (séculos VII ao XIII DC) até a Fase Guarita (séculos IX ao XVI DC) (CABA, 2012). Atualmente a superfície do sítio é coberta por áreas de cultivo de mamão, mandioca e hortaliças e de capoeira (CABA, 2012). Pelos relatos dos moradores da região, a capoeira está abandonada há cerca de 10 anos. Na avaliação local no momento da coleta dos horizontes de Terra Preta, pode-se observar que o solo era bem arenoso, pois a área é próxima à praia, e que os horizontes A e AB condizem com a profundidade de 0-20cm. Logo depois se observou que o solo tornava-se um acinzentado claro, muito provavelmente repleto de silte proveniente do solo logo abaixo.

2.2.2.2. Sítio Hatahara (Hat)

O sítio Hatahara está localizado no município de Iranduba – AM, Brasil, sobre um terraço adjacente à várzea da margem esquerda do Rio Solimões. Possui 1,6 ha onde atualmente é composto por áreas de cultivo de mamão, banana, manga, cana-de-açúcar, de pastagem e de capoeira. Tal capoeira é dita por estar abandonada há cerca de 12 anos. Na superfície é visível uma alta densidade de material cerâmico. O sítio teve 4 ocupações distintas desde 300 AC a 1500 DC: Fase Açutuba (séculos I AC e I AD), Fase Manacapuru (século IV ao século IX DC), a Fase Paredão (séculos VII ao XIII DC) e a Fase Guarita

(séculos IX ao XVI DC) (CABA, 2012). Durante uma das ocupações, fase Paredão, foram construídos montículos artificiais formados pelo acúmulo de terra preta e cacos de cerâmica. Um desses montículos recobre um cemitério de onde foram exumados 25 sepultamentos (CABA, 2012). As coordenadas compreendem: área de capoeira 03°16.494'S 60°12.340'O; área de pastagem 03°16.516'S 60°12.275'O; e área de cultivo de cana-de-açúcar 03°16.514'S 60°12.288'O. Na avaliação local no momento da coleta dos horizontes de Terra Preta, pode-se observar que os horizontes O, A e AB condizem com a profundidade de 0-30cm e se estendia por mais centímetros, podendo chegar a mais de 1m de profundidade. Não se chegou ao horizonte B, classificado em Oxisols (O'NEILL et al., 2009), os Latossolos segundo SIBCS (Embrapa, 2013).

2.2.2.3. Sítio Laguinho (L)

O sítio Laguinho está localizado no município de Iranduba - AM, Brasil, nas coordenadas 03°16.883'S 60°07.762'O, sobre um terraço na calha do rio Solimões e é banhado pelo lago do Iranduba e pelo igarapé Peixe-boi. Possui aproximadamente 8,2 ha de extensão. Nele, foram identificados fragmentos cerâmicos dos quatro conjuntos identificados na região: Fase Açutuba (século IV AC até o século IV D C), a Fase Manacapuru (século IV ao século IX DC), a Fase Paredão (séculos VII ao XIII DC) e a Fase Guarita (séculos IX ao XVI DC) (CABA, 2012). Atualmente sua superfície é utilizada para o cultivo de citros e mamão e também possui capoeira. Pelos relatos dos moradores e pesquisadores da região, tal capoeira está abandonada há cerca de 20 anos. Na avaliação no momento da coleta, pode-se observar que o horizonte A e AB são bem superficiais condizendo com a profundidade de 0-15cm. Logo depois já se viu o horizonte B de coloração clara e amarelada do solo original.

2.2.2.4. Sítio Lago Grande (LG)

O sítio Lago Grande está localizado no município de Iranduba-AM, Brasil, nas coordenadas 03°13.799'S 60°16.150'O, sobre uma de duas penínsulas entrecortadas que comportaram sítios pequenos, estratégicos e sazonais. Possui cerca de 200 ha atualmente coberto por mata secundária e média (capoeira). A primeira ocupação ocorreu entre os séculos I AC e I DC na Fase Açutuba. A segunda ocorreu entre os séculos VII e XII DC na Fase Paredão. Esta segunda ocupação formou uma aldeia em forma de ferradura, com as casas dispostas ao redor de uma praça central. Durante o final da ocupação da aldeia, foi construída uma vala defensiva no istmo que conecta a terra firme à península onde está o sítio. Algumas décadas após a construção da vala, o sítio foi abandonado (CABA, 2012). Atualmente grande parte do sítio é coberta por floresta secundária que está abandonada há cerca de 20 anos. Na avaliação local no momento da coleta dos horizontes de Terra Preta, pode-se observar que os horizontes A e AB condizem com a profundidade de 0-20cm e que logo abaixo o solo é

avermelhado, sendo classificado em Oxisols (O'NEILL et al., 2009), os Latossolos segundo SIBCS (Embrapa, 2013).

2.2.2.5. Sítio Barroso (Bar)

O sítio Barroso não foi estudado até o momento pela equipe de arqueologia do CABA, não havendo disponibilidade de mapas topográficos para este sítio bem como não há estudos arqueológicos de datações das cerâmicas para indicar quando ocorreram as ocupações indígenas nesta área. O sítio está localizado no município de Iranduba – AM, Brasil, nas coordenadas 03°15.770'S 60°06.023'O. Está coberto por cultivos de banana e hortaliças e de floresta secundária. Pelas informações de trabalhadores deste local, a área coberta por floresta secundária está abandonada há cerca de 40 anos. Na superfície do solo observam-se inúmeros artefatos de cerâmica e o solo possui alta concentração de laterita. No momento da coleta, identificam-se os horizontes A e AB como na profundidade de 0-20cm e logo abaixo há um solo avermelhado, sendo classificado em Oxisols (O'NEILL et al., 2009), os Latossolos segundo SIBCS (Embrapa, 2013).

2.3. Compostos dos solos

2.3.1. Matéria orgânica do solo (MOS)

O termo “matéria orgânica do solo” (MOS) refere-se ao conteúdo total de matéria orgânica, incluindo a biomassa (WAKSMAN, 1936). A MOS é definida por células da biota (microrganismos, fungos, plantas e animais) vivas ou mortas em vários estágios de decomposição, estando na liteira ou incorporados ao solo juntamente com os metabólitos dos organismos da MOS (exsudatos das raízes jovens, secreções das raízes, lisados, mucigel, gromalina); derivados da decomposição (substâncias não húmicas e húmus), ou de processos abióticos (carvão vegetal, o biocarvão); pluviolixiviados (ação do ácido carbônico da chuva no carregamento de constituintes orgânicos da superfície da parte aérea das plantas ao solo); resíduos orgânicos (agrícola, urbano ou industrial).

Da porcentagem de MOS dos solos, uma parte é estável em forma de húmus (65-90% da MOS total); há outra parte de MOS que é decomponível (10-40%) e desta parte decomponível fazem parte os organismos vivos (20-40% da MOS decomponível). Assim, 1-4% da MOS total do solo é composta por microrganismos, dentre *Bacteria e Archaea* (30% dos organismos); fungos pluricelulares (50%); leveduras, algas, protozoários, nematóides (10%); ácaros, colêmbolos e outras formas diminutas de artrópodes (10%).

A coloração escura geralmente indica a alta presença de MO devido às frações maiores de ácido húmico e principalmente humina. Tal propriedade confere maior aquecimento do solo e consequente maior atividade microbiana.

Microrganismos presentes na MOS podem ser simbiossiontes da rizosfera ou de vida livre e agregados às partículas de solo, principalmente as de argila. Os fungos podem ser simbiossiontes (fungos micorrízicos arbusculares - FMA) ou livres. As plantas da MOS podem ser raízes, troncos, folhas. Os animais da MOS podem ser desde a microfauna (4 - 100 µm) até a macrofauna (> 2 mm), definidos por serem animais que vivem toda a vida ou parte dela no solo. Toda a biota apresentada participa direta ou indiretamente dos processos biogeoquímicos, atuando na assimilação de gases e nutrientes, conversão de moléculas orgânicas e decomposição da matéria orgânica, alterando as propriedades físicas e biológicas do solo.

Quanto aos metabólitos existentes, os exsudatos são compostos com grande diversidade química, baixa massa molecular, solúveis em água, ou carboidratos do extravasamento de citoplasma (moléculas perdidas por osmose pela baixa umidade do solo). Secreções são compostos com alta massa molecular. Lisados são compostos resultantes da lise das células epidérmicas da raiz. O mucigel é a região complexa entre raiz e solo composta de colóides minerais e orgânicos, células bacterianas e seus produtos metabólicos (mucilagem), com microrganismos aderidos aos glicopolissacarídeos da raiz. A gromalina é a substância produzida nas hifas dos fungos altamente presentes nos solos sadios que ligam as partículas de argila, formando também os agregados. As enzimas existentes no solo produzidas por microrganismos ou plantas apresentam um importante papel na sua fertilidade, sendo capazes de solubilizar nutrientes em formas estáveis, tornando-os disponíveis para a assimilação pelas plantas (TEIXEIRA et al., 2009).

Quanto à distribuição de MO nos solos, podem ser organossolos ou antropossolos (como as Terra Preta de Índio) em que a distribuição é mais homogênea; ou em que há um limite superior da concentração de MO e abaixo apenas partículas de argila, areia e silte; ou uma camada definida de MO entre frações minerais; ou o perfil geral dos solos tropicais em que a porcentagem de MO vai decrescendo conforme a profundidade. Há solos tropicais que possuem 1-2% de MOS dentre o restante de fração mineral, diferente do encontrado em outros tropicais (5% de MOS), havendo ainda solos tropicais com 20% de MOS.

A degradação da MO resulta em material decomponível em diversas formas. A entrada de material orgânico no solo se dá pelo processamento de C (material na superfície do solo, gases, erosão e pluviolixiviação) pelos organismos do solo em que macro, meso e microfauna degradam o bruto e disponibilizam material (frações menores, coprólitos) para a ação dos microrganismos. Estes necessitam de N por ser fator limitante na oxidação

enzimática e que além do solo, procuram nas células das plantas (tanino proteína), ocorrendo a oxidação enzimática e/ou fermentação metanogênica das arqueas para poder incorporar o C.

No todo, 60-80% do C que entra no solo é eliminado como gás CO_2 , 15-20% é transformado em substâncias não-húmicas e húmicas, e 3-8% do C é imobilizado pela biomassa microbiana.

A decomposição da MOS pelos microrganismos depende do material a ser decomposto que pode variar do lábil ao recalcitrante: açúcares, hemicelulose, celulose, lignina, ácidos graxos, polifenóis. No caso da celulose e mais ainda da lignina, além da característica bioquímica, a estrutura molecular ramificada e sua organização em fibras confere maior resistência à degradação.

Assim, a MOS é classificada por MO ativa, lenta e passiva. A fração ativa consiste na biomassa microbiana; na liteira, que fornece energia para os organismos do solo e protege a superfície do solo contra a degradação física (STEVENSON, 1994); além da MOS da fração leve livre, que se trata de carbono acessível aos microrganismos, a qual encontra-se entre os agregados do solo e pode ser rapidamente degradada pela biota do solo. A fração lenta consiste em resíduos orgânicos parcialmente decompostos da fração leve intra-agregada, que está nos agregados estáveis protegida da decomposição pela estrutura do solo e é degradada mais lentamente pela biota do solo. Essas frações ativa e lenta representam cerca de 5 -35% do carbono total do solo e tem a função de fornecer energia para os organismos do solo, além de nutrientes para as plantas através do processo de mineralização. A degradação final de carboidratos, ceras, resinas, proteína, lignina, ácidos graxos, ácidos húmicos resultam na fração lenta ou recalcitrante, dentre elas carvões, macromoléculas saturadas, humina e ácidos húmicos pertencentes às substâncias húmicas.

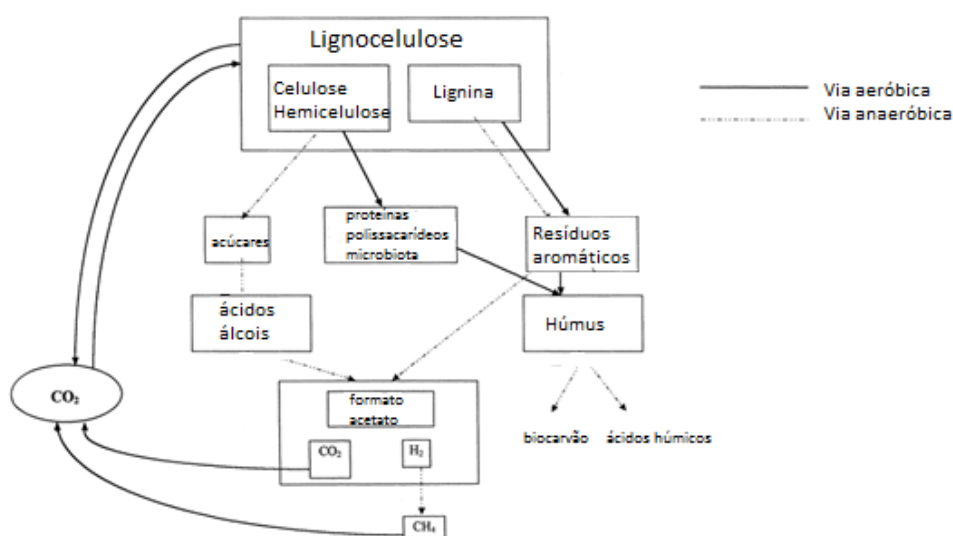


Figura 3 - Ciclo do carbono no solo tropical de TPA. Adaptado de Tuomela et al. (2000)

2.3.2.Substâncias húmicas (SH)

As SH distinguem-se no solo ou em sedimentos em razão de apresentarem características diferentes dos compostos que lhes deram origem (TEIXEIRA et al., 2009). Elas são uma mistura de moléculas estabilizadas por forças fracas (interações hidrofóbicas, pontes de H, forças de van der Waals), possuindo um núcleo com partes hidrofóbicas e o exterior com partes hidrofílicas. Em grande parte, são formadas por reações secundárias de síntese, assim, organismos vivos não as produzem diretamente. Em geral as SH, representam, aproximadamente, 70% do C total do solo. Por isso, exercem grande influência sobre as características físicas e químicas do solo, e conseqüentemente, tem grande influência sobre os atributos de fertilidade (TEIXEIRA et al., 2009). Dentro da fração das substâncias húmicas, diferenciamos quatro frações principais: humina (fração instável em meio aquoso, associada à fase mineral do solo), ácidos húmicos (compostos aromáticos e carbonila de coloração escura, condensados e estáveis, solúveis em meio básico e insolúveis em solução ácida, associados à macromoléculas de alta massa molecular), ácidos fúlvicos (compostos alifáticos, solúveis) e ácido himatomelânico (solúveis em álcool) (TEIXEIRA et al., 2009). Assim, os ácidos húmicos são relativamente mais recalcitrantes.

As TPAs, além de terem maior proporção de carbono na fração ácidos húmicos, contrariamente aos solos não antrópicos, têm uma maior proporção de carbono na fração ácidos fúlvicos e 50% do carbono total é carbono não oxidável, o qual é mais estável e conseqüentemente tem um tempo de persistência maior no solo. Assim, as Terras Pretas possuem frações húmicas quimicamente mais estáveis em função da maior presença de grupamentos aromáticos, do maior grau de polimerização e menor suscetibilidade ao ataque microbiano (TEIXEIRA et al., 2009).

Os ácidos húmicos (AH) são uma das frações mais importantes da matéria orgânica e têm papel fundamental na sustentabilidade das funções do solo, como na acumulação de carbono e na retenção e disponibilização de nutrientes para as plantas.

Estudos demonstram que existe correlação positiva entre AH de Terra Preta com a CTC do solo e soma de bases, atributos da determinação da fertilidade do solo, pois os AH são estáveis à decomposição e lixiviação, além de formar complexos organometálicos, que favorece a acumulação de C orgânico no solo. A maior diferença dos AH de Terra Preta em relação aos solos não antrópicos é que sua origem está nos fragmentos de carvão altamente abundantes nas Terras Pretas, visto que a maior parte do C de Terra Preta está em moléculas aromáticas de AH. Assim, os AH de Terra Preta herdaram parte de sua estrutura do carvão que foi incorporado e transformado por um longo período de tempo contribuindo, assim, para a melhoria das propriedades químicas e físicas do solo, e, conseqüentemente, para a formação de solos de maior potencial produtivo. Deste modo, os ácidos húmicos das Terras Pretas são mais resistentes à termo-degradação, sendo mais estáveis e, ao mesmo tempo, possuem maior

reatividade química, do que os ácidos húmicos de solos adjacentes não antrópicos. Assim, pelas suas características físico-químicas e estruturais, tão desejadas em ambientes tropicais, possibilitam uma maior acumulação de carbono e maior fertilidade e produtividade aos solos na mesma região, em que os desprovidos dessa matéria orgânica são, muitas vezes, obstáculos à produção agrícola sustentável (TEIXEIRA et al., 2009).

2.2.3. Biocarvão

Em muitos solos tropicais são encontrados pequenos fragmentos de carvão resultantes de queimas naturais ou de origem antrópica. Quando estão na forma de fragmentos muito pequenos, os carvões absorvem compostos orgânicos solúveis, retêm água e podem servir como abrigo para microrganismos do solo (BENITES et al., 2005).

A pirólise parcial da matéria orgânica de lignocelulose (MEIRA, 2002) que ocorre por volta de 180°C (ROHDE, 2007) é uma forma de surgimento de biocarvão e, consequentemente, de hidrocarbonetos aromáticos.

Na combustão que leva ou não à produção de carvão, existem os termos pirólise e o queima. A pirólise se refere ao processo de combustão que deixa resíduos de carbono, ou seja, o carvão. Já a queima é o processo de combustão que consome a totalidade do carbono orgânico existente no material, evaporando CO₂ e dioxinas, restando apenas cinzas, formadas por compostos inorgânicos (PEACOCKE; JOSEPH, s/d). Assim, na pirólise ocorre a desmineralização e retirada de átomos de H e O ficando o resíduo predominantemente composto de ligações de C condensadas e resistentes, as unidades aromáticas (6C em ressonância), com concentrações de C entre 70 e 80%. Estas podem ser únicas ou inúmeras, como as poliaromáticas. Na pirólise parcial do material vegetal também são formadas cinzas, dioxinas e compostos clorados.

O resíduo originado, o carvão, é um sólido de coloração negra brilhante, poroso, friável, composto por cinzas, materiais voláteis condensados e carbono fixo (WENZL, 1970). Sua forma molecular se resume a estruturas parecidas com grafite (pequenos agrupamentos aromáticos reticulados que formam folhas maiores) (MAIA; MADARI; NOVOTNY, 2011), sendo "compostos de grafite" ou grafeno, que diferem em suas ligações com grupos funcionais podendo ser classificados em diferentes tipos de compostos aromáticos.

O teor de cinzas do carvão corresponde ao resíduo de óxido-minerais após combustão (MEIRA, 2002). O teor de carbono fixo corresponde ao carbono que permaneceu intacto após a combustão e se apresenta em porcentagem maior em relação ao material orgânico original (MEIRA, 2002), sendo proporcional ao teor de lignina na madeira (COLLET, 1955) pelo conceito de que madeira com maior presença de materiais de natureza aromática, como extrativos e a lignina, resultará em um carvão mais denso, com maior poder calorífico

(OPARINA² et al., 1971, apud BRITO; BARRICHELO, 1977) e mais resistente em termos de propriedades físico-químicas (SATANOKA, 1963). Na indústria, o teor de carbono fixo (TCF) é indicador de qualidade por queimar mais lentamente (MEIRA, 2002).

É conhecido por diversas denominações: carvão vegetal, carvão orgânico, biocarvão (biochar), carbono pirogênico.

O termo biocarvão foi primeiro utilizado por Karaosmanoglu e colaboradores (2000) e por Demirbas (2004) para restringir o carvão vegetal que é utilizado no solo e que proporciona benefícios a este e ao meio ambiente, como o sequestro de carbono (LEHMANN; JOSEPH, 2009) e a produção vegetal.

O termo *black carbon* designa todos os resíduos de incineração ricos em carbono. O carvão vegetal pode ser denominado *char* que é o resultado de queimadas; ou de *charcoal*, que é o carvão produzido para ser combustível. Ainda há o carvão ativado, um *char* processado por vaporização, ou agentes químicos, a altas temperaturas (>700°C) (BOEHM, 1994) para aumentar sua microporosidade e poder ser usado como agente filtrante, descontaminante e catalisador.

Deste modo, o biocarvão que nos referimos neste trabalho é um *char* produzido por pirólise que atua na promoção do bem ambiental.

Cada solo possui um histórico de pedogênese, uma vez que rochas matrizes diferentes, e fatores de modificação abióticos e bióticos, incluindo o antrópico, modificam diferentemente este ambiente. Em relação ao carvão, isto também é válido, uma vez que diversos materiais orgânicos podem sofrer pirólise com diferentes condições de temperatura e tempo e originar carvões de tamanhos, poros e de concentrações diferentes de hidrocarbonetos aromáticos. Além da ação do meio que pode modificar os carvões em relação ao seu tamanho e dinâmica no solo.

Os fragmentos de biocarvão são as estruturas mais recalcitrantes da MOS. Embora as formas de proteção do biocarvão e a sua estrutura química ainda não sejam completamente compreendidas, a maior estabilidade do biocarvão deve-se à sua estrutura poliaromática, composição molecular e morfologia que variam conforme sua origem (POIRIER et al., 2000), sendo resistente à oxidação termal, química e foto-oxidação (SKJEMSTAD et al, 1996), resultando em AH altamente aromatizados.

A presença de fragmentos de carvão no solo se deve a históricos de incêndios naturais ou provocados, como por exemplo, os solos brasileiros de Cerrado (ROSCOE et al., 2001), ambientes rupestres altimontanos (BENITES et al., 2005) e os solos antrópicos da Amazônia, como as TPA. As queimadas em sistemas florestais e agrícolas, com consequente produção de

² OPARINA, L. V. et al. **Sb. Tr. Vses. Nauch.-Issled. Inst. Gidroliza Rast. Mater.**, v.19, p. 176-86, 1971.

carvão frequentemente exercem importantes efeitos sobre a fertilidade dos solos (WARDLE et al., 1998; KLEINMAN et al., 1995). O carvão ocorre no solo de Terra Preta tanto na forma protegida quanto na desprotegida.

Sua incorporação no solo é parte importante do sequestro de carbono (SCHMIDT et al., 2000; GLASER et al., 2001; MASIELLO, 2004) por as partes oxidadas de sua superfície produzirem grupos carboxílicos ou outros grupos funcionais com carga líquida negativa, o que pode ser a razão da elevadas trocas catiônicas (CTC) (NOVOTNY et al., 2009), do pH mais baixo das TPAs (GLASER et al., 2003) e da maior acidez total da MOS. São características que proporcionam a interação da MOS em agregados, além da influência na percolação da água, reduzindo a lixiviação dos nutrientes no solo.

Liang et al. (2006) por meio de espectroscopia de adsorção de raio X de estruturas finas (NEXAFS) observaram que as partículas da superfície do carvão se apresentavam oxidadas, o que indica a presença de material orgânico adsorvido. Em adição, ocorre retenção de água pela estrutura porosa do carvão que consiste em 70-80% do seu volume (Figura 4), além de os fragmentos de carvão modificarem a profundidade, textura, estrutura, porosidade e consistência do solo pelas influencias da área de superfície do biocarvão no tamanho dos poros, distribuição das partículas, alterando a agregação e densidade do solo. Assim, a profundidade de penetração é alterada.

Conforme Mccann et al. (2001) e Glaser (2007), a quantidade de matéria orgânica estável, ou seja, substâncias húmicas ou carvão, é até três vezes superior nas TPAs em relação aos solos adjacentes, correspondendo a em torno de 35% da matéria orgânica presente no horizonte A (GLASER et al., 2000) das TPAs, pela alta presença de matéria orgânica decomposta e de carvão vegetal ou orgânico, sendo proporcional ao conteúdo de argila. Nos solos adjacentes o carvão corresponde a apenas 14% da matéria orgânica (GERMANO, 2011), onde ocorre rápida decomposição pelas altas temperaturas, precipitação elevada e deficiência de minerais.

Além disso, a umidade do carvão e existência de matéria orgânica e grupos funcionais adsorvidos sugerem que fragmentos de carvão no solo podem consistir em um microhabitat para os microrganismos (PIETIKAINEN et al., 2000; ZANETTI et al., 2003) que podem ser benéficos à lavoura (ZANETTI et al., 2003).

Assim, o biocarvão e o húmus na interação com partículas de argila são aspectos que impactam positivamente o crescimento vegetal, proporcionando aos solos de TPA características de um ambiente eutrófico (BRADY;WEIL, 2008).

Como exemplo prático, o carvão peneirado na granulação de 2 a 5 mm, umedecido com solução de extrato pirolenhoso é utilizado em culturas no Japão como fertilizante orgânico com excelentes resultados no desenvolvimento radicular nas culturas de arroz (TSUZUKI et al., 1989), açúcar (UDDIN et al., 1995), batata doce (DU et al., 1998) e melão

(DU et al., 1997). Outros estudos avaliaram o efeito da adubação com carvão sobre as propriedades físico-hídricas e químicas do solo (GLASER et al., 2002).

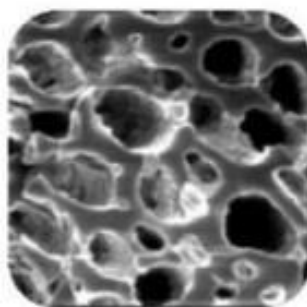


Figura 4 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fragmento de carvão cedida por Mateus de Souza Terceti, citado por Germano (2011)

Desse modo, a alta concentração de carvão vegetal nos solos de TPA pela sua pedogênese antrópica pode ter contribuído para a formação de comunidades microbianas nesses microhabitats, de processos biológicos importantes ao solo, promoção de resistência aos intemperismos, concentração de nutrientes, alta fertilidade do solo e consequente produtividade agrícola e sustentabilidade (GLASER et al., 2003; STEINER et al., 2004).

Apesar de se saber que comunidades microbianas respondem de forma complexa ao fogo e ao carvão vegetal (PIETIKAINEN et al., 2000) e de quais grupos bacterianos estão presentes no microhabitat (CANNANAN, 2011), a interação dos microrganismos com o carvão necessita de mais estudos envolvendo o papel do carvão e suas comunidades microbianas na manutenção das propriedades físicas, químicas e das características biológicas dos solos TPA (GERMANO, 2011).

Como, por exemplo, é importante ecologicamente se estudar a diversidade funcional de grupos microbianos diretamente envolvidos nos ciclos biogeoquímicos e no caso, é necessário avaliar o papel dos solos TPA e do carvão pirogênico na manutenção de comunidades bacterianas que atuam em processos específicos no solo. O resultado de tais estudos seria o uso de resíduos vegetais carbonizados como condicionadores do solo no Brasil (STEINER et al., 2004) e para efeitos supressivos (MENDES et al., 2011).

A alta atividade biológica observada nas TPAs sugere que a transformação dos resíduos da carbonização deve ser mediada por organismos, seja pela ação direta sobre o carvão, ou ainda pela liberação de enzimas capazes de transformar quimicamente esses substratos (BENITES et al., 2009).

Além da conformação molecular e estrutural do carvão, os bio-óleos são cogitados como influentes na biota dos carvões. Estudos relatam que os bio-óleos são liberados na pirólise (MAGGIAND DELMON, 1994; BRIDGWATER; BOOCOCK, 1997; GUAN, 2004),

porém há poucas análises sobre a residência de moléculas orgânicas na superfície do biocarvão. Estudos de Schnitzer et al. (2007) identificaram bio-óleos como pertencendo a seis grupos: n-heterocíclicos como metil e etil pirrol substitutos, pirimidina, pirazinas e pteridina; furanos substitutos; fenol e fenóis substitutos; benzeno e benzenos substitutos; carbocíclicos e alifáticos. O alcanos variaram de 7C a 19C. Alguns desses compostos como buteno são conhecidos como importantes germinadores para espécies nativas (DIXON³, 1998, apud LEHMANN; JOSEPH, 2007), ou como promotores de crescimento de microrganismos, como os sesquiterpenos (AKIYAMA; HAYASHI, 2006) ou os conhecidos como *smoke vinegar* que possuem propriedades biocidas (GUAN⁴, 2004, apud LEHMANN, JOSEPH, 2007).

2.4. Diversidade microbiana dos solos de Terra Preta de Índio

Os seres vivos dividem-se em três domínios eucariotos - *Animalia*, *Plantae*, *Fungae*- e em dois domínios procariotos- *Bacteria* e *Archaea*. Os microrganismos eucariotos e procariotos compreendem a maior parte da biota terrestre (LAMBAIS et al., 2005), sendo que Whitman et al. (1998) constatou uma distribuição de 2-3% nas águas dos oceanos; 4,5-6,5% no solo e a vasta maioria na sub-superfície da Terra (LAMBAIS et al., 2005).

O domínio *Bacteria* compreende 25 filos e o domínio *Archaea*, 23 filos (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Os autores Lewinsohn e Prado estimaram em 2002 que no Brasil existia entre 300 a 450 espécies de bactérias conhecidas, e no mundo, o número seria de 4200 espécies de bactérias. Isso demonstra a necessidade de mais estudos para desvendar a diversidade microbiana.

Os microrganismos do solo são fundamentais para a persistência da fertilidade conforme demonstrado em levantamento sobre as comunidades microbianas em quatro solos de TPAs e adjacências (O'NEILL et al., 2009). São essenciais para o funcionamento dos ecossistemas por suas atividades fragmentadoras e decompositoras da matéria orgânica, disponibilizadoras de nutrientes, na remoção de toxinas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002), atividades supressoras de patógenos, dentre outras. Há uma notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética nos microrganismos (KURTBOKE; SWINGS; STORMS, 2004), o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos que na bioprospecção serão de grande valia para o avanço tecnológico.

A alta presença de material orgânico e a grande atividade biológica indicam que há uma alta diversidade microbiana nas TPAs, constituindo numa fonte de germoplasma microbiano (TSAI et al., 2003). Ainda são poucas as informações sobre a função da biodiversidade na

³ Dixon, K. 1998. **Smoke Germination of Australian Plants, RIRDC report (98/108, KPW-1A)**, Kings Park and Botanic Garden Plant Science Division, Perth, Australia.

⁴ Guan, M. 2004. **Manual for Bamboo Charcoal Production and Utilization**. Bamboo Engineering Research Center, Nanjing Forestry University, China.

fertilidade destes solos. Os maiores estudos em TPAs estão voltados aos aspectos geológicos, antropológicos, e atualmente os aspectos biológicos como a diversidade microbiana e estudos de bioprospecção estão sendo feitos.

Nas TPAs os fungos e bactérias atuam na liteira para decomposição a fim de garantir a incorporação dos elementos minerais no solo. *Rhizobium*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, fungos micorrízicos e solubilizadores de fosfato são microrganismos do solo que têm importância no desenvolvimento das plantas, dentre outras funções (FARIAS; OLIVEIRA, 1994).

Pode ser que alguns microrganismos das TPAs são capazes de atuar na síntese das substâncias húmicas de forma mais eficiente que outros microrganismos encontrados em solos adjacentes, o que pode ter contribuído para a conformação do solo. A alta presença de compostos complexos de carbono pode selecionar os que possuem genomas com mecanismos específicos que os permitem sobreviver em meio a esses substratos.

2.4.1. Diversidade microbiana no biocarvão

O carvão como microhabitat é uma abordagem recente que ainda não foi totalmente esgotada e mais estudos são bem-vindos na busca por microrganismos com elevado potencial biotecnológico. Nos trabalhos relacionados está o de Navarrete et al. (2010) que estudaram a diversidade de fragmentos de carvão de TPA e observaram a predominância dos filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Bacteroidetes*, sendo as *Actinobacteria* mais abundantes em carvão em relação aos solos de TPA. O trabalho de Cannavan (2011) corrobora a predominância dos filos de *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*, trazendo a informação quantitativa de que este último filo constitui 20% da diversidade, e adiciona o gênero *Crenarchaeotae* de *Archaea* à diversidade.

O trabalho de Khodadad et al. (2011) indica que solos tratados com carvão vegetal tiveram um aumento na abundância de *Actinobacteria* e *Gemmatimonadales*, indicando a estreita relação do biocarvão com determinadas comunidades microbianas.

Germano (2011) estudou os degradadores de compostos aromáticos, de suma importância para viabilizar a descontaminação biológica de ambientes (biorremediação), que implica em diminuição de gastos e menor impacto ambiental em relação aos processos de remediação química e física. O estudo por meio de bibliotecas genômicas resultou em muitas sequências de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*, grupos bacterianos altamente ditos como biodegradadores e neste caso, confirmam a capacidade de degradar e utilizar o substrato do carvão das TPAs.

Os trabalhos mostram uma alta diversidade de bactérias presentes no carvão vegetal dos solos de TPA e de utilização do substrato abundante no carvão, os compostos aromáticos.



Figura 5 - Imagens por microscopia fluorescência (a) e microscopia confocal (b) demonstram a presença de microrganismos vivos na superfície do carvão. Fonte: Grossman et al. (2006)

2.5. Biodegradação de hidrocarbonetos

Hidrocarbonetos são compostos formados por carbono (C) e hidrogênio (H), podendo haver átomos de oxigênio (O), nitrogênio (N) ou enxofre (S), dando origem a diferentes compostos de outros grupos funcionais. São também conhecidos por hidrocarburetos, carboidretos, carbetos, carburetos ou carbonetos de hidrogênio. Estão presentes na constituição da matéria orgânica de origem vegetal e animal como na superfície cerácea das folhas, óleos vegetais, componentes de fito e zooplâncton, cutículas de insetos e lipídeos de microrganismos, além de serem os principais constituintes do petróleo e de produtos derivados do óleo, e originam-se da diagênese de precursores naturais, como compostos orgânicos esteróides, da erosão de sedimentos continentais e da exsudação de petróleo a partir de fendas oceânicas (UNEP, 1991).

A importância da transformação química destes materiais se deve às suas altas concentrações serem ameaçadoras à saúde animal. A interação química com organismos vivos é maléfica e está relacionada à intoxicação, ocorrência de mutações genéticas e câncer. Em relação aos alcanos, outra necessidade de transformação química é devido ao impedimento da sua quebra e plena utilização deste material pela indústria sucroalcooleira, que levaria a um maior rendimento e produção de bioetanol de 2ª geração, além dos acúmulos deste material nos tanques da indústria petroleira, que compromete seu funcionamento.

O tratamento biológico de solos contaminados com hidrocarbonetos é uma alternativa ao tratamento físico-químico, porque oferece vantagens potenciais como a destruição completa do poluente e baixo custo (VIDALI, 2001). A biorremediação ocorre através de atividades enzimáticas de microrganismos (bactérias, arqueas e fungos), os quais utilizam o

carbono dos compostos para obtenção de energia, possibilitando seu crescimento e sobrevivência.

A forma de biorremediação mais atrativa em termos econômicos e de eficácia é a estimulação da microbiota degradadora existente no ambiente por meio de temperaturas ótimas e fornecimento de nutrientes de inicialização e elétrons aceptores, ou seja, a bioaugmentação (MROZIK; PIOTROWSKA-SEGETB, 2010).

Os principais substratos orgânicos nas reações de biodegradação por microrganismos são os hidrocarbonetos, sendo degradados principalmente por bactérias e fungos. Embora amplamente presentes nos ecossistemas terrestre e aquático, a fração total da comunidade heterótrofa representada por bactérias e fungos que utilizam hidrocarbonetos é altamente variável, com frequências de 6% a 82% para fungos do solo; 0,13% a 50% para bactérias do solo e 0,003% a 100% para bactérias marinhas. As bactérias são conhecidas por possuírem amplo espectro de utilização de substratos, tanto hidrocarbonetos saturados, quanto aromáticos. Organismos individuais podem metabolizar apenas uma gama limitada de hidrocarbonetos, de forma que comunidades microbianas mistas com ampla capacidade enzimática são necessárias para degradar misturas complexas de hidrocarbonetos, como o petróleo bruto (BRITTON, 1984).

A biodegradação por microrganismos é um mecanismo de adaptação para a sobrevivência da comunidade microbiana no ambiente com altas concentrações desses compostos, uma vez que a transferência de genes e a mutação são essenciais para o metabolismo de diferentes compostos de carbono (BARKAY; PRITCHARD, 1988; SPAIN; van VELD, 1983). Assim, muitas pesquisas tem focado na degradação biológica de hidrocarbonetos saturados e aromáticos através do metabolismo ou co-metabolismo (PENG et al., 2008).

A degradação de hidrocarbonetos por bactérias se deve a genes contidos nos plasmídeos ou no DNA nuclear, ou em ambos (PARK; CROWLEY, 2006). São genes que unidos produzem enzimas compostas que degradam determinados substratos e permitem a utilização destes como fonte de carbono e energia (LYNCH; HOBBIE, 1988). Os processos de degradação envolve um maquinário de enzimas: hidroxigenases, dehalogenases, dehidrogenases e sistema de hidrolases (MISHRA; LAL; SRINIVASAN, 2001).

Entre os muitos microrganismos que são encontrados nas TPAs, as bactérias mais abundantes são dos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria* e *Actinobacteria* (NAVARRETE et al., 2010; GERMANO et al., 2012). Alguns membros possuem uma infinidade de características benéficas para ecologia e economia, sendo também biodegradadores. Assim, estudos detalhados com esses grupos se tornam necessários para descobrir novas estratégias para usos na biotecnologia, agricultura e farmácia.

É bastante conhecida a ação de enzimas catabólicas expressas por espécies bacterianas filogeneticamente distintas na degradação de compostos biogênicos (por exemplo, a lignina e compostos celulares), compostos antropogênicos e compostos derivados de reações abióticas (hidrocarbonetos aromáticos gerados em sedimentos por diagênese, entre outros) (WACKETT, 2004). Entretanto, a grande maioria das enzimas catabólicas ainda não foi identificada, purificada e caracterizada, embora existam ao menos 10 milhões de substratos orgânicos conhecidos por serem biodegradáveis. Deste total, apenas 10.000 têm sido estudados em relação ao microrganismo capaz de metabolizá-lo, e em torno de 0,001% destes compostos foi caracterizada detalhadamente.

Estudos com isolamento em associação com análises moleculares compreendem a melhor forma para analisar a fisiologia e filogenia de um organismo. Assim, bioensaios são cruciais para constatar a eficiência da atividade por meio de condições controladas em avaliações laboratoriais (ATLAS, 1995).

2.5.1. Biodegradação de hidrocarbonetos saturados (n-alcenos)

Os hidrocarbonetos saturados (alcenos, ou parafinas) são moléculas constituídas somente por átomos de hidrogênio e oxigênio com ligações covalentes simples lineares (n-alcenos), ramificados (isoparafinas) ou não (C_nH_{2n+2}), ou cíclicos (C_nH_{2n}) (cicloalcenos ou naftenos), possuindo uma estrutura de carbono envolta por átomos de hidrogênio, com ou sem grupos funcionais, aos quais se ligam por forças de van der Waals. As formas linear, ramificada e cíclica podem estar ligadas, consistindo nos alcenos complexos. Os alcenos diferem em relação à massa molecular, a qual condiz com a quantidade de átomos de carbono na molécula e são classificados em relação a quantos carbonos existem (ACD/STRUCTURE ELUCIDATOR, 2014). O alceno mais simples é o gás metano (CH_4) e a partir dele não há limites para o número de C em uma molécula, chegando a um sólido hexacontano ($C_{60}H_{122}$).

Nas condições normais de temperatura e pressão, até C_4H_{10} os alcenos são gasosos; a partir disso até $C_{17}H_{36}$ os alcenos são líquidos e depois disso são sólidos. Não são muito reativos por serem apolares, não reagem a ácidos ou bases, possuindo pouca atividade biológica em relação a outros compostos. Porém, sofrem reações de redox com oxigênio e halogênios quando o C está na forma reduzida (ligado a H), além de interagirem com complexos metálicos.

Os alcenos são encontrados no gás natural, no óleo cru (petróleo bruto) e derivados; nos oceanos sob forma condensada de metano clatrato; na lignina, cutícula e resinas vegetais, nas ceras e óleos de folhas e essência de flores; componentes de fito e zooplâncton; cutícula de insetos; em feromônios de animais e insetos, como no almíscar de veados; óleo de fígado de peixes; na atmosfera como resultado da produção de metano por microrganismos

metanogênicos, as *Archaea*, em locais anóxicos e tratos digestivos de monogástricos, mas principalmente de ruminantes, cupins e minhocas.

Quando liberados no ambiente, os alcanos não são prontamente degradados devido à inexistência de grupos funcionais utilizados pela maioria dos microrganismos. Microrganismos degradadores de alcanos são comumente encontrados em todos os solos, porém sua abundância aumenta em solos poluídos por este hidrocarboneto. Dentre eles, muitas bactérias podem metabolizar alcanos, bem como muitos fungos, porém este substrato somente seria utilizado como fonte de carbono e energia quando na escassez de outras fontes (ROJO, 2009). Este consórcio de microrganismos é responsável pela ciclagem de C, dentre outros nutrientes, nos ambientes naturais.

As bactérias degradam principalmente os alcanos menores e lineares, em que o átomo de C das extremidades é oxidado. Os microrganismos acessam o substrato por adesão às partículas de alcano ou pela produção de surfactantes que facilitam seu processamento para o interior das células (ROJO, 2009) em água. O produto é um álcool, o qual é oxidado em aldeído e, na etapa seguinte, em ácido carboxílico. Este é então metabolizado pelo processo de degradação de ácidos graxos.

Todavia há bactérias especializadas, as chamadas hidrocarbonoclastas (GOLYSHINA et al., 2003). Como a bactéria marinha *Alcanivorax borkumensis* que pode consumir alcanos lineares e angulares, porém é incapaz de metabolizar substratos mais simples como hidrocarbonetos aromáticos, açúcares, aminoácidos, gorduras e outras fontes de carbono (YAKIMOV et al., 1998; SCHNEIKER et al., 2006).

Os genes envolvidos pela degradação dos alcanos utilizados nos *screenings* de bactérias são os genes responsáveis pela ligação da membrana de alcano hidrolases de ferro não hemo, os genes da família *alk*, os quais conferem a especificidade da enzima ao substrato. Genes das alcano hidrolases são encontrados em alta frequência em populações microbianas de ambientes contaminados por óleo (SOTSKY et al., 1994). Porém, os genes *alk* não são os únicos envolvidos na degradação de alcanos, havendo outros sistemas de oxidação de alcanos não relacionados (SMITS et al., 1999). Somente poucas enzimas são conhecidas na via metabólica de degradação de alcanos e muitos sistemas com função semelhante não foram caracterizados, sendo desconhecidos.

2.5.2. Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) formam uma classe de compostos orgânicos hidrofóbicos que consistem na fusão de dois ou mais anéis benzênicos em arranjos lineares a angulares ou em agrupamentos específicos (HABE; OMORI, 2003), e são encontrados no ambiente em consequência da madeira processada e formação de carvão, lama

de petróleo, asfalto, entre outros. Estes contaminantes podem ser tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, e persistem nos ecossistemas por anos como consequência da baixa solubilidade em água e da adsorção em partículas sólidas.

Hidrocarbonetos aromáticos (HAs) no solo são provenientes de diferentes formas. Pode ser devido aos processos de decomposição biológica da matéria orgânica lignocelulósica que originam os ácidos húmicos do solo; ou por processos de incineração incompleta do material orgânico lignocelulósico, restando moléculas recalcitrantes (HARVEY, 1991).

Além disso, as atividades de produção de carvão vegetal, de extração e gaseificação do carvão mineral e a cadeia de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados são também responsáveis pela introdução de grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos no ambiente.

	PAH	MW	Sol (mg/L)
			
	Naphthalene	128.2	31.700
			
	Acenaphthene	154.2	3.900
			
	Anthracene	178.2	0.070
			
	Phenanthrene	178.2	1.300
			
	Fluoranthene	202.3	0.260
			
	Pyrene	202.3	0.140
			
	Benz[a]anthracene	228.3	0.002
			
	Benzo[a]pyrene	252.3	0.003

Figura 6 -Resumo dos compostos aromáticos quanto a sua recalcitrância e toxicologia, retirada de Cerniglia (1992)

Da decomposição dos materiais orgânicos, originam-se as frações do húmus mais resistentes: a humina e os ácidos húmicos. Essas são moléculas condensadas, com anéis aromáticos, sendo que os ácidos húmicos possuem maior condensação com anéis aromáticos e menor relação H/C e O/C, e são denominados pela IUPAC (1997) em arenos, conhecidos também por família aromática ou hidrocarbonetos aromáticos. Os ácidos húmicos são ditos de originarem principalmente da decomposição de material lignocelulósico.

Ao mesmo tempo, hidrocarbonetos aromáticos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e outros são contaminantes comumente encontrados no solo e água pela atividade petroleira e descarte de resíduos industriais, sendo listados como poluentes principais pela U.S. Environmental Protection Agency que classifica os HPAs a seguir como os principais

poluentes ambientais: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, indeno[1,2,3-dc]pireno e dibenz[a,h]antraceno.

Com base na sua abundância e toxicidade, os compostos de hidrocarbonetos, principalmente os poliaromáticos, têm sido considerados prioritários na busca por soluções de descontaminação (GEHLE, 2009).

A capacidade de degradar e/ou utilizar hidrocarbonetos aromáticos é exibida por uma grande variedade de gêneros bacterianos e fungos. Floodgate (1984) listou 25 gêneros de bactérias e 27 gêneros de fungos degradadores de hidrocarbonetos, que foram isolados do ambiente marinho. Uma compilação semelhante de Bossert e Bartha (1984) para isolados do solo inclui 22 gêneros de bactérias e 31 gêneros de fungos. Com base no número de publicações, os mais importantes gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em ambientes no solo são *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia* e *Pseudomonas* spp.

As vias metabólicas de clivagem dos HPAs mais estudadas são as aeróbicas, realizadas por bactérias e fungos onde ocorre a oxigenação dos anéis aromáticos por meio de complexos enzimáticos conhecidos como oxigenases. Várias oxidações permitem a abertura dos anéis e a formação do piruvato, que é utilizado como fonte de carbono e energia pelas células (MISHRA et al., 2001).

A biodegradação aeróbica é frequentemente inicializada pelas ferro dioxigenases não-heme de Rieske, as quais catalizam a incorporação de dois átomos de oxigênio dentro do anel aromático formando arenos cis-diols, seguido de uma reação de dehidrogenação catalizada pela desidrogenase cis-dihidriol para originar catecol e catecóis substitutos, os quais servirão como substrato para a clivagem dos anéis aromáticos oxigenolíticos (WITZIG et al., 2006).

As enzimas ferro-oxigenases não-heme de Rieske são formadas por vários componentes de uma oxigenase terminal chamada de proteína ferro-sulfúrica (ISP; iron-sulfur protein) e diferentes proteínas transportadoras de elétrons, como ferredoxina e a redutase, ou uma combinada ferredoxina-NADH-redutase. As proteínas ISP são multiméricas, formadas por uma subunidade α maior e uma subunidade β menor, as quais formam o cluster tipo Rieske [2Fe-2S], isto é, um centro mononuclear não-heme de ferro de ativação de oxigênio e um sítio de afinidade ao substrato que é responsável pela especificidade da dioxigenase ao substrato (SIMON et al., 1993; GIBSON; PARALES, 2000).

Existe forte relação homóloga e análoga entre as dioxigenases relacionadas à degradação de HPAs e o gene prospectado é o alfa-ARHD da subunidade alfa das dioxigenases aromáticas. As subfamílias tolueno/bifenil, naftaleno, benzoato e ftalato podem degradar substratos em comum e o gene prospectado são os *bph* (WITZIG et al., 2006). Porém, também são observadas enzimas que somente degradam especificamente um substrato ou parte da molécula, como já foi observado dioxigenases que degradam bifenis, clorobenzeno e naftaleno, as quais possuem modificações sutis em suas sequências ISP.

Comparações de sequências de aminoácidos das subunidades α terminais de oxigenases (ISP α) revelaram que as enzimas formam famílias de especificidades diferentes mas que são evolutivamente relacionadas, sendo que quatro (NAM et al., 2001) e cinco (KWEON et al., 2008) linhagens foram caracterizadas. O que se sabe das oxigenases Rieske de ferro não-hemo provem de bactérias cultivadas. Assim, estudos independentes de cultivo sugerem maior diversidade em genes funcionais, muitos dos quais são desconhecidos. Assim, o estudo dos genes análogos e homólogos envolvidos na síntese de enzimas degradadoras de poluentes e xenobióticos, juntamente com estudos sobre diversidade genética destas estirpes, podem informar sobre o comportamento destes microrganismos. Pesquisadores, como Vasconsellos (2010) fizeram bibliotecas com fismídeos detentores de operons inteiros associados à biodegradação de hexano e fenantreno. As bactérias passíveis de terem o operon foram as β e γ - proteobactérias como *Pseudomonas*, *Burkholderia* e outras que degradam tanto pela via aeróbica, quanto anaeróbica. Obtiveram também isolados de bioensaios com microcosmos e o sequenciamento completo do genoma identificou genes similares a ADHs (álcois) e ALDHs (aldolases), bem como novos operons. Também realizaram testes de Drop Collapse Method em Biolog, seguido de pirosequenciamento, do qual conseguiram a afiliação genética dos reads de operons e identificaram os gêneros bacterianos detentores dos operons.

2.5.2.1. Biodegradação de bifenil

O bifenil ou fenilbenzeno é o hidrocarboneto aromático em que dois anéis benzênicos estão ligados por uma ligação simples. A partir desses hidrocarbonetos é possível a geração dos bifenilos policlorados (PCBs), através da união da molécula de bifenil com um ou mais átomos de cloro. Esses compostos são constituídos por moléculas orgânicas produzidas comercialmente pela cloração direta da molécula de bifenil usando cloro de ferro como catalisador. A molécula de bifenil contém em sua estrutura dois anéis conectados com seis átomos de carbono cada, portanto uma molécula de PCB é qualquer molécula que apresente um ou múltiplos cloros ligados ao núcleo de bifenil. As moléculas de cloro podem estar ligadas a qualquer um ou a todos dos dez sítios disponíveis, sendo teoricamente possível a formação de 209 diferentes compostos de PCBs (BEDARD et al., 1987).

Bifenil é catabolizado em benzoato e 2-hidroxy-penta-2,4-dienoate através de quatro etapas com quatro enzimas. Após crescerem em bifenil, muitas bactérias são capazes de degradar bifenis policlorados (PCBs), um grupo de compostos artificiais recalcitrante e tóxico. Assim, a via metabólica de PCBs utiliza as mesmas enzimas da via metabólica de degradação de bifenil (LINDEN; SUN, 2011).

Sendo assim, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), os bifenilos e os bifenilos policlorados (PCBs) constituem os principais hidrocarbonetos com potencial para a contaminação de ecossistemas e, portanto, têm sido foco em estudos de biodegradação, principalmente na busca de genes microbianos associados à degradação total e/ou parcial destes compostos em diferentes sistemas.

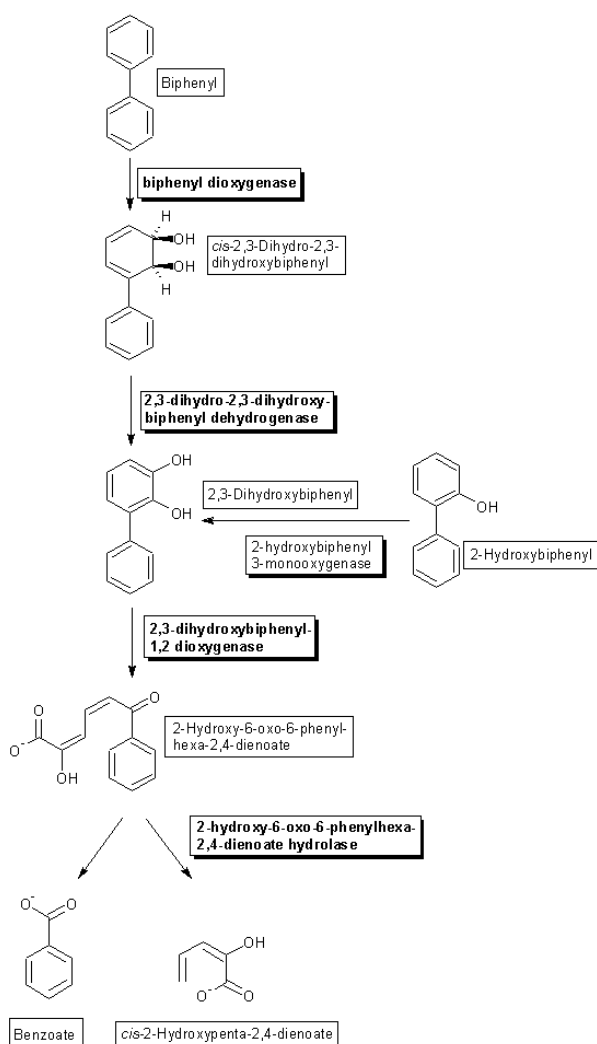


Figura 8 - Via metabólica de degradação de bifenil por *Pseudomonas* sp. LB400.

Fonte: Compounds and Reactions BBD (http://eawag-bbd.ethz.ch/bph/bph_map.html)

2.5.3. Misturas de hidrocarbonetos

2.5.3.1. Lignocelulose

Os constituintes orgânicos da matéria a ser decomposta no solo possuem diferentes resistências e velocidades de decomposição e os mais resistentes ao processo são os materiais constituintes das paredes celulares vegetais como a lignina, os compostos fenólicos, lipídeos, celulose e hemicelulose. Tal propriedade destes materiais se deve à conformação molecular muito resistente, que por sua vez é devida aos tipos de átomos presentes e suas ligações.

Lignocelulose é a estrutura composta por celulose, hemicelulose e lignina que compõe as paredes celulares das plantas, sendo o principal componente da biomassa vegetal (LEE, 1997).

A hidrólise enzimática de lignocelulose é de grande importância para os ciclos biogeoquímicos e biotecnologia na produção de combustíveis sustentáveis, os biocombustíveis, bem como polímeros e derivados químicos importantes para aplicações em alimentos, bebidas, agropecuária, têxtil, detergentes e papel. Os biocombustíveis mais conhecidos são o bioetanol e biodiesel. O processo mais interessante é a conversão microbiana direta, ou *consolidated bioprocessing* (CBP), envolvendo a secreção de celulase que hidroliza a celulose em uma fermentação de uma única etapa, uma vez que fornece custos baixos pela alta eficiência, rapidez e baixo consumo de energia. Para isso, os microrganismos escolhidos teriam que consumir altas quantidades de substrato com rápida e alta conversão no produto final de interesse. Porém, até o momento não foi encontrado um organismo capaz de realizar todas as etapas de degradação, sendo que na natureza os microrganismos agem em consórcio.

Cao et al. (2014) encontraram bactérias mesotermófilas capazes de degradar completamente a lignocelulose produzindo hidrogênio provenientes de ambientes ricos neste substrato e as bactérias encontradas foram *Clostridium*, *Paenibacillus* e *Thermoanaerobacterium*. Deste modo, precisa-se entender seu genoma e os possíveis genes associados à degradação de lignocelulose.

2.5.3.1.1. Biodegradação de celulose e hemicelulose

A celulose é um homo polissacarídeo linear consistido de 7000-15000 subunidades de glicose unidas por ligações β 1-4 glicosídicas (LEDERBERG⁵, 1992, apud DAS et al., 2013) organizadas em microfibrilas com partes cristalinas e não-cristalinas (FERNANDES et al.,

⁵ Lederberg J. **Cellulases**, 1992. In: Encyclopaedia of Microbiology 1; A-C, Academic Press, Inc.

2011) e estas regiões não-cristalinas, que compreendem 1% da celulose, são as mais acessíveis à degradação por erosão e biológica (RUEL et al., 2012).

A denominação geral das enzimas degradadoras de celulose é celulase, um complexo de enzimas extracelulares que reagem à celulose cristalina, e já foram catalogadas mais de 20 subunidades catalíticas dessa multienzima apresentando diversas atividades: endonuclease, exoglucanase, xilanase, mananase, quitinase e liquenase (ZHANG; LYND, 2005). Há geralmente três tipos de enzimas: endo-1,4- β -glucanase (carboxymethylcellulase, ou Cx cellulase) que atacam regiões pouco cristalinas; cellobiohydrolase (exoglucanases, CBH, Avicelase, C1 cellulase ou FPase) que liberam unidades de celobiose; e β -glucosidase (cellobiase) que quebram a celobiose em glucose (YUE et al., 2009).

A hemicelulose é uma cadeia de polissacarídeos amorfa com 500-3000 unidades de grupos acidificados (BODIG; JAYNE, 1982,) os quais compreendem xiloglucanos, xilanas, glucomananas e galacto-glucomananas. É a segunda molécula mais abundante na macromolécula de lignocelulose (PENG et al., 2012).

Muitas bactérias e fungos produzem celulases extracelulares quando em meio a substratos de celulose. *Trichonympha*, *Clostridium*, *Actinomycetes*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus albus* são algumas das bactérias com atividade celulolítica (GUPTA; SAMANT; SAHU, 2012), sendo que bactérias anaeróbicas como *Clostridium* e *Rumminococcus* apresentam completos enzimáticos chamados de celulomonas que permanecem fixados na parede celular (LYND et al., 2002). As demais secretam enzimas no meio.

2.5.31.2. Biodegradação de lignina

Por fim, a lignina é a terceira porção que compõe a lignocelulose. A lignina é a macromolécula mais abundante e resistente que possui substâncias aromáticas na biosfera (VICUÑA, 1988). Compõem entre 10 a 30% da lignocelulose das células vegetais. Este heteropolímero orgânico é composto de diferentes lignanas – formadas de duas metades de p-propilfenol e átomos de carbono β – e de unidades repetidas de fenilpropilbenzeno ligados de forma randômica (IUPAC, 2006) a várias ligações C—C e C—O—C não-hidrolisados (ADLER, 1977), formando quinonas com organização estrutural estratificada, em fibras e de distribuição estereoirregular.

A complexidade da estrutura molecular aliada aos hidrocarbonetos que a compõem faz com que este material seja extremamente recalcitrante. Ao contrário da celulose e hemicelulose, sua degradação não produz açúcares fermentáveis por compostos fenólicos serem produzidos e estes inibem a fermentação. Alguns microrganismos como determinados protozoários, fungos e bactérias são capazes de mineralizar tal material.

A degradação de lignina por fungos já é bem conhecida e estes são capazes de mineralizar lignina de forma muito eficiente pela liberação de uma família de enzimas denominadas ligninases (TIEN; KIRK, 1983; LEISOLA et al., 1987).

Já para bactérias, este material é muito recalcitrante e, a um primeiro golpe de vista, bactérias apenas exercem um papel secundário na degradação da lignina (JANSHEKAR; FIETCHER, 1983; KIRK; FARELL, 1987). Enzimas de bactérias ainda não foram totalmente estudadas. Somente foi encontrada uma peroxidase extracelular de uma actinobactéria (AHMAN et al., 2011) e foram descritas degradações bacterianas para substratos de baixo peso molecular por enzimas intracelulares, as quais realizam todas as reações de degradação de lignina, exceto a primeira etapa que é a clivagem de ligações intermonoméricas. (KERN; KIRK, 1987).

Outro fator da limitação da degradação de lignina por bactérias é que as enzimas bacterianas seriam mais específicas e, assim, necessitariam de um consórcio de bactérias e outros microrganismos para degradar completamente a macromolécula. O papel das bactérias neste consórcio permanece desconhecido por completo (CHANDRA et al., 2007). Porém, sabe-se que a especificidade das enzimas bacterianas recaem não somente na qualidade dos átomos, mas, também, na configuração espacial e muitas enzimas são estereoespecíficas. Podem existir ao mesmo tempo enzimas estereoespecíficas ou não, sendo que misturas de moléculas modelo para lignina são completamente consumidas por cepas bacterianas únicas (ALWORTH⁶, 1972, apud VICUÑA, 1988).

No geral, as bactérias degradadoras de lignina são gama e alfa proteobactérias, actinobactérias e alguns firmicutes. Por exemplo, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Streptomyces* degradam prontamente os anéis aromáticos únicos que formam a macromolécula de lignina, porém não se sabe ainda a proporção desta capacidade e se elas conseguem mineralizar por completo a macromolécula (DAGLEY, 1971; CRAWFORD, 1981). Já os Firmicutes, como *Paenibacillus* e *Bacillus* degradam apenas monômeros derivados da lignina (CHANDRA et al., 2007).

Muitos estudos de biodegradação de lignina com bactérias se desenvolvem com a utilização de lignina sintética a partir do álcool coníferico de broto de milho, originando os materiais DHPs (dehydrogenative polymerizates) com uma quantidade de lignina em torno de 7-8%. (TROJANOWSKI; HAIDER; SUNDMAN, 1977). E segundo Pometto e Crawford 1986, as condições ótimas para mineralização de lignocelulose são pH neutro, enquanto que para a solubilização da lignina o melhor é o meio alcalino. Outro substrato mais bruto seria a lignina kraft, um liquor negro proveniente da indústria de papel com alta concentração de alcali clorofenol lignina e outros componentes crus solúveis (CHANDRA et al., 2007). Moléculas encontradas na lignina também são utilizadas para monitoramento de capacidade

⁶Alworth, W. L. Stereochemistry and Its Application in Biochemistry Wiley-Interscience, New York, 1972.

de degradação *in vitro*, dentre elas estão: bifenil, hemicelulose, arilglicerol- β -aril éter (β -O-4), guaiacilglicerol- β -coniferil (III), veratrilconiferol- β -coniferil éter (IV) e outras moléculas com estruturas relacionadas.

Em torno de 10% dos fenilpropanos encontrados na lignina limpa são conectados por ligações de bifenil. Sabe-se que proteobactérias degradam bifenil através da ação de suas oxigenases que introduzem oxigênio molecular dentro dos anéis do bifenil e formam cis-hidrodiol, o qual é dehidrogenado em 2,3-bifenildiol que, então é quebrado e origina ácido benzóico. As enzimas bifenil dioxigenase, a dehidrogenase e a clivadora de anel benzênico são provenientes do operon *bph* (VICUÑA, 1988).

Ligações β -O-4 são abundantes nas macromoléculas de lignina e a quebra delas por bactérias é algo importante a ser considerado na busca de organismos capazes de degradar lignina. Tais ligações são prontamente degradadas por gamaproteobactérias, como *Pseudomonas* spp. (CRAWFORD et al., 1981) por diversas dehidrogenases. A estrutura de bifenil é tão estável que a degradação deste substrato é um fator limitante na degradação de lignina (PENG et al., 1999). E o composto utilizado como modelo para avaliações da clivagem dessas ligações é o DDVA (5,5'-dehydrodivanillate).

A quebra da lignocelulose em monômeros de glicose é a base para a produção de bioetanol de segunda-geração (THE ROYAL SOCIETY, 2008). Deste modo, há um considerável interesse em tecnologias para despolimerizar lignina.

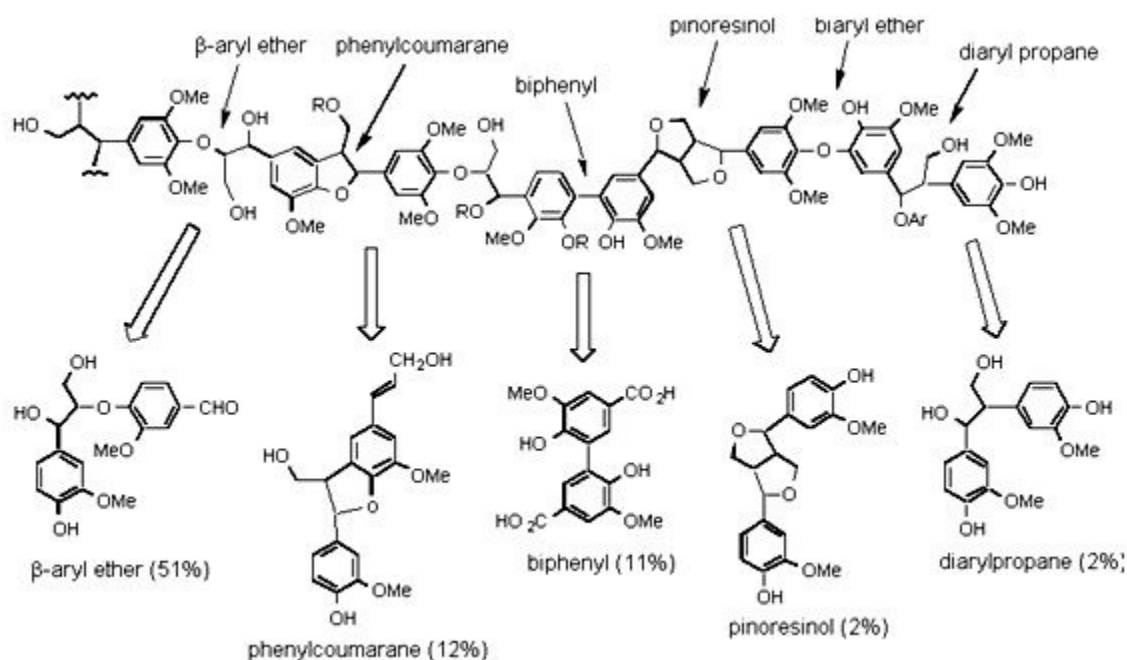


Figura 9 - Via metabólica de degradação da macromolécula de lignina e seus compostos derivados da primeira clivagem efetuado por bactérias (BUGG, 2012)

2.5.3.2. Biodegradação de petróleo

Este material é um exemplo da presença de hidrocarbonetos de todos os tipos. Este óleo cru é formado por parte hidrofóbica composta por grupos de hidrocarbonetos, e parte hidrofílica, os metais pesados. A parte dos hidrocarbonetos é composta por hidrocarbonetos alifáticos saturados (n-alcenos); hidrocarbonetos cíclicos (cicloalcenos) e os hidrocarbonetos aromáticos. Os alcenos são encontrados na fração de parafina que compõem de 15-60% do petróleo, as quais são compostas de 20 a 40 carbonos. Os cicloalcenos são encontrados na fração de naftenos, os quais compõem de 30-60% do petróleo e cuja fórmula geral é C_nH_{2n} . Os hidrocarbonetos aromáticos são encontrados na fração aromática do petróleo e compõem 3-30% deste e são identificados por terem anéis aromáticos (ou benzênicos) em sua molécula. Por fim estão os asfaltenos, moléculas também consideradas hidrocarbonetos aromáticos, porém mais pesadas e compõem a menor fração restante do petróleo. Os alcenos são separados por destilação fracionada e processados em diversos produtos.

O petróleo leve, com altas porcentagens de hidrocarbonetos em sua composição, é mais viável como fonte de combustível. Em contrapartida, um petróleo denso, com altos teores de asfaltenos, possui menor potencial de inflamabilidade, sendo mais difíceis de processar em combustível e é destinado na produção de plásticos, asfalto, borrachas e outros. As reservas de petróleo leve são escassas e as refinarias têm de processar o óleo denso e betume (este é composto por 35 ou mais C), para obtenção de combustível. Tal processamento utiliza muita energia pela necessidade da retirada de carbono e adição de hidrogênio, sendo um processo mais custoso e danoso ao meio ambiente (Petroleum.co.uk, 2013).

Além da qualidade inicial do óleo cru, ocorre uma modificação química deste petróleo nos reservatórios pela biodegradação do mesmo por microrganismos autóctones. Estes transformam óleos leves em óleos pesados que acabam por modificar a qualidade do óleo. Esta fração pesada constitui-se principalmente de asfaltenos, cuja temperatura de ebulição é maior e estes acabam por se solidificar nos tanques e obstruir as vias, dificultando e encarecendo a produção do petróleo.

Há também as substâncias surfactantes produzidas por microrganismos que podem ser utilizadas na descontaminação do solo, retirando metais pesados como cádmio, bem como hidrocarbonetos aromáticos. A surfactina é uma enzima com grande capacidade de redução da tensão superficial em baixas concentrações e é de grande interesse na indústria de limpeza, na descontaminação de óleos na lavagem de solos, remoção de metais pesados e destruição dos asfaltenos nos reservatórios de petróleo. As principais bactérias produtoras de surfactina são *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e as actinobactérias (FARIA et al., 2011; LIMA et al., 2011).

2.5.3.3. Biodegradação de óleo diesel

O diesel é uma mistura complexa de hidrocarbonetos formada de 40% de alcanos (principalmente hexadecanos), 39% de cicloalcanos, 20% de HPAs e o restante é enxofre, oxigênio e nitrogênio. Contém cadeias carbônicas de 5 a 40 carbonos por molécula e é proveniente da destilação do petróleo (VIEIRA et al., 2007). Os hexadecanos possuem um teor de combustão muito alto e em baixas temperaturas se tornam mais viscosos, fluindo diferentemente.

É considerado medianamente tóxico, inflamável, volátil e de coloração variando do amarelo ao âmbar. No Brasil, dois tipos de diesel são comercializados como combustível: o diesel D (também chamado de urbano ou metropolitano) e o diesel B (comum), que se diferenciam pelo teor de enxofre, sendo que o urbano contém somente 0,5% de enxofre, reduzindo os impactos ambientais.

Existem cerca de 360 trabalhos relacionados à degradação de diesel por microrganismos e plantas (Pubmed acesso em 03/12/13).

2.5.4. Bioensaios de degradação

Para caracterizar um isolado bacteriano sobre seu potencial de degradação dois caminhos devem ocorrer em conjunto: 1) a avaliação da capacidade degradativa do isolado perante ao substrato de interesse através do monitoramento de sua atividade com substâncias indicativas de degradação (como DMSO, DAP, DCPIP) e medição por espectroscopia de fluorescência; 2) avaliação do poder degradador quanto ao tempo e quantidade pela medição inicial e final do substrato no meio e de gás carbônico liberado (relacionar a quantidade de substrato com a de células no ensaio), bem como o carbono incorporado medindo a quantidade existente nas células (por meio de marcadores atômicos), levando em conta fatores abióticos, como a despolimerização; 3) comprovação da posse do gene que codifica para as enzimas envolvidas por técnicas de biologia molecular, as quais envolvem a amplificação da região de interesse do DNA do isolado, seu sequenciamento seguido de análises estruturais *in silico*. A este estudo podem-se agregar análises de filogenia para compreensão da relação entre o gene do isolado com os depositados nos bancos de dados, servindo de informação à taxonomia e ecologia microbiana.

Sayler et al. (1985), por exemplo, usando a técnica de hibridação de colônia, demonstrou a correlação entre o aumento de taxas de mineralização de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em sedimentos contaminados com óleo e o aumento de número de colônias contendo sequências de DNA que hibridavam com os plasmídeos TOL (oxidação do toluato) e NAH (oxidação do naftaleno) (RODRIGUES, 2002).

A utilização de uma fonte de carbono prontamente utilizável como co-fator, como extrato de levedura ou glicose, auxilia no aumento de células no ensaio e, conseqüentemente, aumenta a proporção de degradação do substrato. Porém, estudos sugerem que em algumas cepas ocorre inibição da degradação com a adição de fonte prontas de carbono e, principalmente, falsos positivos.

2.5.5. Técnicas moleculares

O estudo dos microrganismos pode ocorrer por meio de cultivo tradicional, ou por métodos moleculares. O método de cultivo permite estudá-los individualmente e caracterizá-los quanto aos critérios nutricionais e bioquímicos, sendo limitado ao não abranger de forma considerável a diversidade existente no solo devido às dificuldades laboratoriais de cultivá-los, sendo, então, chamados de microrganismos não cultiváveis (PACE, 1997), porém o certo é organismos não cultivados em vista de que podem ser cultivados no caso de se utilizar as condições corretas no isolamento. Amann et al. (1995) sugerem que apenas uma pequena fração de 0,1% a 10% dos organismos existentes na natureza sejam cultivados através das técnicas tradicionais microbiológicas, impedindo o estudo de uma vasta porção da biota, das interações ecológicas entre os microrganismos e, conseqüentemente, do ambiente.

Já na abordagem molecular, tal estudo de biodiversidade do solo é por meio do entendimento das relações ecológicas entre os microrganismos. Os métodos moleculares envolvem técnicas de sequenciamento de trechos de interesse do DNA, como genes contendo sequências conservadas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e ao mesmo tempo contendo sequências variáveis do ponto de vista filogenético. Como exemplo, o gene 16S rRNA (ácido ribonucléico ribossomal) que é largamente utilizado para comparar organismos quanto a sua proximidade filogenética, bem como o estudo de riquezas e abundâncias relativas que junto com outros parâmetros englobam as diversidades.

Assim, as técnicas moleculares desempenham um papel fundamental para os estudos da ecologia de microrganismos, contribuindo para obter e comparar informações essenciais ao entendimento da composição, estrutura e função das comunidades microbianas no solo (ROSADO et al., 1997; TIEDJE et al., 1999; HANDELSMAN; SMALLA, 2003; KIRK et al., 2004; SCHÜTTE et al., 2008).

Grande parte dessas técnicas é associada à PCR (Polymerase Chain Reaction) e suas variações são largamente utilizadas nos estudos de biodiversidade microbiana dos ambientes (REIS JUNIOR et al., 2003) que permite a obtenção por amplificação dos fragmentos-alvo a um número detectável de acordo com a sensibilidade do equipamento utilizado, como por exemplo, as análises de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), as bibliotecas de genes, sequenciamento

de DNA, PCR quantitativo em tempo real (qPCR), entre muitas outras técnicas.

2.5.5.1. Identificação molecular de isolados bacterianos

Por possuírem metabolismo muito versátil, as espécies bacterianas apresentam variedade fenotípica dependendo da fonte de carbono utilizada no meio de cultura, adquirindo diversas formas e colorações e uma identificação por meio de métodos fenotípicos torna-se não exato. Deste modo, análises moleculares de genes conservados vem a complementar e levam a um novo patamar de informações e correlações.

Assim, o uso de técnicas dependentes de cultivo aliada às independentes tornam o processo de identificação mais preciso.

2.5.5.1.1. Análises filogenéticas e sequências de 16S rRNA

Os genes rRNA são universalmente distribuídos nos diferentes grupos de seres vivos – procariotos e eucariotos – sendo a molécula que apresenta o maior grau de conservação. O ribossomo bacteriano é formado pelo RNA ribossomal e proteínas. Os genes rRNA de procariotos (domínios *Bacteria* e *Archaea*) é dividido em subunidade maior 40S e a subunidade menor 30S. Na subunidade maior estão os genes 23S e 5S rRNA e mais 31 proteínas. Na subunidade menor está o gene 16S rRNA. Este é um fragmento de aproximadamente 1500 nucleotídios e gera grande quantidade de informações úteis para estudos filogenéticos em procariotos (AMANN; LUDWIG, 1995). O estudo envolve análises de sequências do gene 16S rRNA e comparação com as sequências depositadas em bancos de dados como o GenBank, RDP, EMBL, (COUTINHO et al., 1999) e EZTaxon-e acessíveis gratuitamente. A comparação de sequências de 16S rRNA é uma ferramenta importante para a determinação de relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos (WEISBURG et al., 1991), na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD et al., 1998).

2.5.5.2. Estudos moleculares das bactérias dos solos de TPA da Amazônia e adjacências

Hoje o estudo é baseado num conjunto de métodos tradicionalmente utilizados - como a detecção e identificação das bactérias por meio da obtenção de carbono, exigências nutricionais, meio de cultivo e microscópio (KENNEDY, 1999; HERBERT, 1990) e por métodos resultantes dos avanços da biologia molecular, como extração de DNA, amplificação por PCR, clonagem de DNA e sequenciamento.

Nos trópicos, várias espécies de microrganismos são de ocorrência geral, sendo encontradas em todas as amostras de solos, enquanto outras são restritas a ambientes específicos, como exemplos, fungos predominam em condições de acidez, algumas bactérias

filamentosas (actinobactérias) preferem solos orgânicos com pH neutro a ligeiramente alcalinos.

A microbiota do solo encontra-se em contínua interação entre espécies, ocorrendo condições de sinergismo, de antagonismo, de mutualismo, na maioria das vezes com parasitismo e outras vezes de saprofitismo.

Estudos de amostras de solo não-perturbado (floresta) e perturbado (pastagem) na região Amazônica oriental utilizando técnicas moleculares (amplificação, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA) demonstraram a ocorrência de microrganismos pouco comuns de amostras ambientais. Os resultados das análises revelaram a predominância do domínio *Bacteria*, 98%, em relação ao *Archaea*, 2%, e de haver algumas sequências distintas que sugerem uma divisão do grupo *Proteobacteria* (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997).

Tsai et al. (2003) avaliaram a diversidade bacteriana de solos de TPA perturbados com capoeira (de uso agrícola anterior) coletados na Estação Experimental de Iranduba, pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, por meio de técnicas moleculares baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA. O estudo revelou uma alta diversidade bacteriana, além de ocorrência de bactérias não cultivadas.

Kim et al. em 2007 realizaram estudos de diversidade bacteriana com os solos de floresta e solos TPAs na região da Amazônia Ocidental com análises moleculares do gene 16S rRNA de 1500 clones e observaram que os solos de TPA apresentam 25% a mais de diversidade bacteriana em relação aos solos adjacentes.

Com base nesses dados, os organismos de TPA devem ter contribuído para a fertilidade e capacidade estável destes solos, porque e além das propriedades físicas comuns às TPAs, a diversidade bacteriana parece ser constante entre as manchas de TPA estudadas, havendo geralmente os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* como dominantes, além do *Verrucomicrobia* e *Bacteroidetes* (NAVARRETE et al., 2010; GERMANO et al., 2012) além de *Archaea*. Ainda assim, é demonstrada a necessidade de mais estudos nesses ambientes, os quais podem ser *hot spots* de diversidade bacteriana pouco conhecida, ainda mais em relação aos compartimentos deste solo, como os fragmentos de biocarvão abundantes.

No pirosequenciamento do gene α -ARHD de solo e biocarvão de TPA em Germano (2011) houve a descoberta de grupos mistos de sequências de tolueno/bifenil dioxigenases, além de enzimas para degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos, como o naftaleno e o fenantreno, demonstrando a extensa diversidade de genes funcionais presentes nas TPAs.

Atualmente há um grande interesse na elucidação da gênese de TPA para, possibilitar a replicação desses solos e bioprospecção de novos microrganismos que na era biotecnológica tornam-se essenciais, visto que o uso dos microrganismos e derivados vêm sendo utilizados

durante séculos e de forma acelerada nas áreas de saúde, alimentos, indústrias e meio ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O fato de a Terra Preta de Índio da Amazônia possuir alta concentração de fragmentos de biocarvão e estes serem micro-habitats para microrganismos, as perguntas se resumem a: *Há bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos e saturados, os quais são altamente presentes no biocarvão e no solo, aumentando a humificação da matéria orgânica do solo, o teor de os ácidos húmicos e trocas catiônicas, o que poderia estar relacionado à alta fertilidade apresentada pelos solos de TPA?*

Deste modo, intentou-se estudar a riqueza e funcionalidade de bactérias em relação à biodegradação de hidrocarbonetos saturados e aromáticos por isolamento e ensaios de biodegradação, a fim de entender a relação das bactérias com a produtividade dos solos de TPA e enriquecer a caracterização de sua fertilidade e, possivelmente, num futuro findar na aplicação de suas colônias, ou aplicação de seus produtos, ou transplantação do biocarvão em si a culturas agrícolas brasileiras como alternativa a fertilizantes.

Deve-se evidenciar que nenhum isolamento bacteriano do biocarvão de TPA foi realizado até o momento e o presente trabalho teve esta abordagem inovadora para os solos de TPA. Este trabalho trará uma nova visão do funcionamento do ciclo do carbono com atuação de bactérias do biocarvão nos solos de TPA, explorando as capacidades de degradação de hidrocarbonetos saturados e aromáticos.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar bactérias do carvão por cinco meios de cultura, analisar filogeneticamente as sequências de 16S ribossomal e prospectar os genes funcionais para biodegradação de hidrocarbonetos saturados e aromáticos, genes *alk* e *bph*, respectivamente.
- Analisar filogeneticamente os isolados pelo sequenciamento de seus genes *alkB* e *alkM* e *bph*.
- Realizar bioensaios de biodegradação com substratos específicos para averiguar a capacidade de utilização dos mesmos.

4.METODOLOGIA

4.1. Local de coleta

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP. Foram escolhidas cinco manchas de Terra Preta de Índio da Amazônia (TPA) cobertas de floresta secundária (capoeira) localizadas no município do Iranduba-AM, as quais foram: Laquinho (L) sob as coordenadas 03°16.883'S60°07.762'O, Barroso (Bar) sob as coordenadas 03°15.770'S60°06.023'O, Lago Grande (LG) sob as coordenadas 03°13.799'S60°16.150'O Costa do Açutuba (Açu) sob as coordenadas 03°05.829'S60°21.340'O e Hatahara (Hat) sob as coordenadas 03°16.494'S60°12.340'O. Na campanha de campo realizada em Outubro de 2012, todas as áreas de TPA sob cobertura de capoeira foram amostradas, como também um solo adjacente a todas as áreas de TPA em pontos demarcados, sob as coordenadas 03°15.964'S60°10.013'O. O clima na semana de coleta foi caracterizado por temperaturas médias mínimas de 23°C e médias máximas de 34°C, com média de chuvas de 20mm.

Os pontos de coleta foram georeferenciados (Figura 10) e foram demarcados três pontos por mancha de TPA com distância de 15m entre si e 3 subpontos distantes 2m entre si (Figura 11). De cada trincheira foram retirados 3 sacos de 200g de solo das profundidades 0-30cm para os métodos molecular e de cultivo. Foram, portanto, 9 amostras por tratamento, totalizando 45 amostras.

Foram coletadas, também, de cada ponto, amostras para análises químicas havendo 3 sacos de 250g de solo retirado da profundidade de 0-30cm; e para as análises físicas por 3 cilindros de metal de 10x10cm por ponto, os quais foram inseridos no solo com o auxílio de martelo de borracha, havendo anteriormente a remoção da superfície do solo com serrapilheira e, após, nivelando as superfícies do cilindro vazado. Tais amostras físicas foram então embrulhadas com papel filme e, por cima, o papel alumínio.

Todas as amostras foram acondicionadas em isopores refrigerados, transportados por via aérea de Manaus-AM até o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba-SP, e armazenados em câmara fria a 4°C para posterior separação manual dos fragmentos de carvão.



Figura 10 - Localização das áreas de coleta no município de Iranduba marcados nas visitas com auxílio de Global Position System. Cortesia de Mendes, L.W

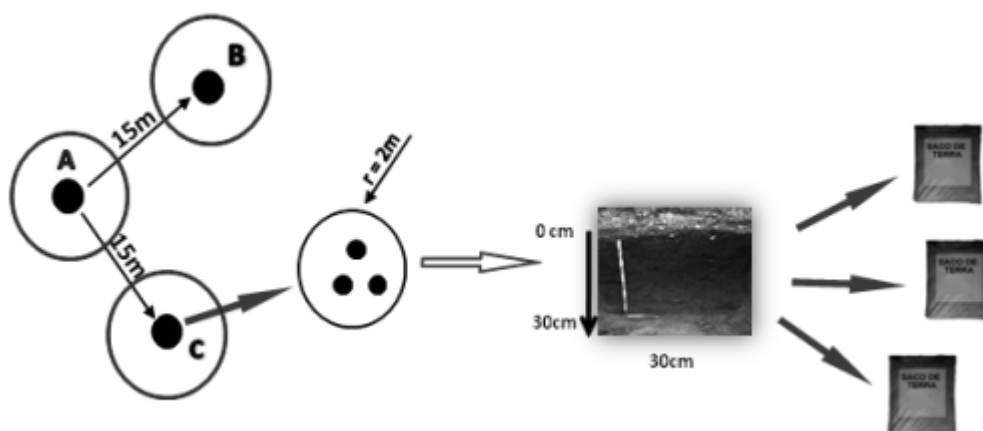


Figura 11 - Delineamento da coleta de campo de cada mancha de TPA. Modificado da cortesia de Yoshiura, C.A

4.2. Análises físicas e químicas do solo

As caracterizações químicas e físicas dos solos foram realizadas no Departamento de Ciências do Solo na Escola Superior “Luiz de Queiroz”– ESALQ/USP. Os métodos utilizados pela empresa para a extração dos nutrientes do solo foram os seguintes: pH em água e pH em KCl pelo método potenciométrico; matéria orgânica (M.O.) pelo método Walkley-Black modificado por diferença de densidade óptica; P pelo extrator Mehlich; K e Na por Fotometria de Emissão; Ca e Mg trocável por Espectrometria de Absorção Atômica; Al -

extração pelo KCl 1mol.l-1; Acidez Potencial (H+Al) pelo método potenciométrico do SMP (Schmacker, Mclean, Pratt); areia, silte e argila -Bouyoucos (densímetro), S.S.S.A. Book Series: 5 Methods of Soil Analysis Part4 -Classe de diâmetro (mm) USDA.

4.3. Separação do carvão

A separação manual dos fragmentos de carvão se deu sobre papel sulfite irradiado, com auxílio de lupa e pinça de ponta fina esterilizada de forma que cada diminuto fragmento de carvão fosse coletado cuidadosamente e que o excesso de partículas de solo de sua superfície fosse retirado. Esta etapa se traduziu na mais crítica, além de crucial, ao presente projeto devido ao seu longo período e dispêndio de vasta dedicação da pesquisadora – em torno de 2 meses de dedicação. A segregação do carvão foi feita em triplicata para cada sítio, em que uma amostra de 350mg de carvão por ponto foi isolada utilizando um cooler para manutenção dos fragmentos de carvão selecionados sob baixa temperatura. Alíquotas de 250mg foram separadas para extração de DNA, enquanto os 100mg restantes foram destinados ao cultivo. As 3 alíquotas de carvão de cada ponto destinadas à extração de DNA, depois de separadas em tubos de 2ml, foram misturadas e novamente divididas originando 3 amostras por ponto. Os 100mg de cada ponto destinados ao cultivo foram macerados um a um, diluídas em 90ml de Solução Salina a 0,85% e, por fim, plaqueados em triplicata, resultando em 9 placas iniciais por área.

4.4. Metodologia dependente de cultivo

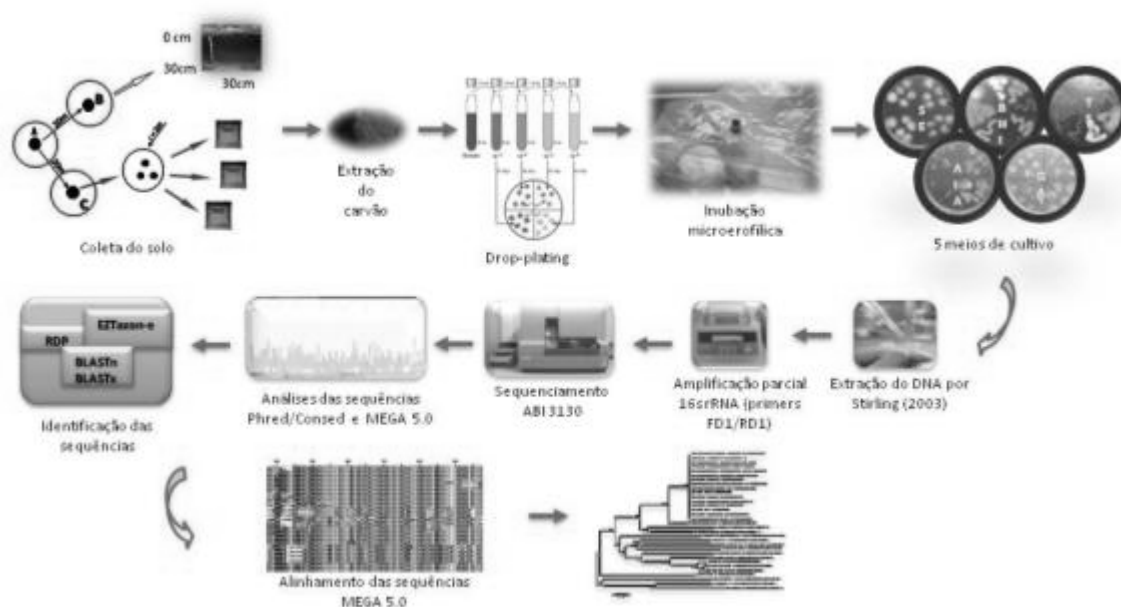


Figura 12 - Visão global da metodologia dependente de cultivo

Como já dito, para o isolamento de bactérias do carvão, foram colocados 100mg de carvão em 9ml de solução salina 0,85%, já iniciando com diluição 10^3 . As diluições seriadas posteriores se deram por 1ml da solução anterior, mais concentrada, adicionado a 9ml de solução salina e assim por diante até a diluição 10^6 . As diluições 10^3 a 10^6 foram plaqueadas em triplicata em placas com quatro quadrantes, em uma adaptação da técnica drop-plating de Herigstad, Hamilton e Heersink (2001). Foram aplicadas 5 gotas de $2\mu\text{l}$ de cada diluição em cada quadrante, conforme a Figura 2. Deste modo, foram nove placas por área totalizando 63 placas por meio de cultura, contando com cinco áreas e três tratamentos em uma delas.

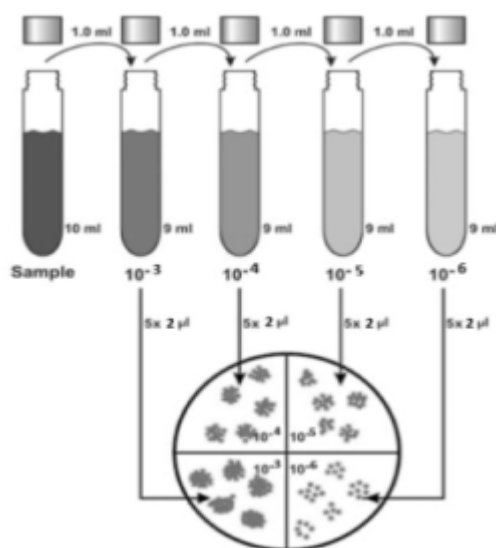


Figura 13 - Diluição seriada seguida de técnica drop-plating em placas de 90x 15 (20ml de meio) a serem crescidas em meio microaerofílico por 7 dias a 32°C

4.4.1. Meios de cultura sólido para isolamento em placa

Foram utilizados meios sólidos seletivos para bactérias em geral – BHI (Brain-Heart-Infusion Agar) (Merck Microbiology), TSA (Trypticase Soy Agar) de Leavitt, Naidorf e Shugaevsky (1955) e Soil Extract Medium, uma modificação de Hamaki et al. (2005); e meios seletivos para o filo Actinobacteria ou alguns gêneros – AIA (Actinomyces Isolation Agar, Difco), GA (Wageningen University medium).

Os meios Difcotm Actinomycetes Isolation Agar (Becton, Dickinson and Company) e Brain Heart Infusion Agar for Microbiology (Merck Microbiology) foram adquiridos prontos. Já os outros meios, procedeu-se a elaboração em laboratório.

a) Preparo Soil Extract Agar Medium

O meio Soil Extract Agar para o presente trabalho foi uma adaptação do trabalho de Hamaki et al. (2005). A partir do solo de TPI intacto coletado a 0-30cm de profundidade da capoeira do Sítio Hatahara pela equipe do Lab. Biologia Celular e Molecular em Julho de

2012, retirou-se 250g de solo que foram peneirados à granulidade de 0,5mm. Este foi adicionado a 600ml de NaOH a 50Mm e incubou-se overnight à temperatura ambiente em agitador magnético. Peneirou-se por 2 lances de peneiras de solo de metal (granulidades de 50mm e 1 mm) e coou-se em papel filtro. Centrifugou-se a 18000 rpm durante 1h. Após o resfriamento do meio, 0,05g do antifúngico cicloheximida (descontaminado por irradiação UV) foi adicionado ao meio e este foi vertido nas placas.

b) Preparo TSA

Semelhante a meios de reativação de esporos. O meio TSA foi preparado de acordo com Leavitt, Naidorf ; Shugaevsk (1955) com os seguintes componentes (g/l): 15g de caseína; 5g de soybean meal; 5g NaCl; 15g de ágar. O pH final do meio 7.3 ± 0.2 à 25°C.

c) Preparo de GA Medium

Meio mais específico para Actinobacteria. Foram elaborados meios com dois hidrocarbonetos: o naftaleno, molécula que contém apenas 1 anel benzênico, e o fenantreno, molécula que possui 2 anéis benzênicos, sendo esta de maior dificuldade de degradação. Foram assim escolhidos para que houvesse maior seleção de bactérias, preferencialmente actinobactérias, capazes de degradar hidrocarbonetos poliaromáticos e assim, viver no substrato carvão, o qual é um conjunto de moléculas de hidrocarbonetos poliaromáticos. A elaboração seguiu-se do seguinte modo (g/L): 5g de cada hidrocarboneto dissolvidos em 10ml de NaCl a 0,2N (0,117g em 10ml); 0,5g de Na_2HPO_4 ; 0,05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,71g de KCl; 0,02g de CaCO_3 ; 18g de ágar e completou-se com água destilada para 1L de meio. Ajustou-se o pH para 7,2 e o meio foi autoclavado. Após o resfriamento do meio, 0,05g de cicloheximida e 1ml de solução de vitamina B foi adicionado. Solução estoque de vitamina B (g/100ml): 50mg V B1 (tiamina hidrocloreada), V B2 (riboflavina), VB3 (nicotinamida), V B6 (piridoxina hidrocloreada), VB5 (cálcio pantotenado), V B8 (inositol) e PABA (ácido para-aminobenzoico), 25mg V B7 (biotina) e 100mL água destilada.

Tabela 2 - Composição dos meios utilizados no isolamento (AIA, BHI, TSA, SE, GA) e de concentração de células para extração de DNA (NB) e posterior crescimento para bioensaios

	AIA	BHI	TSA	SE	GA	NB
ác.húmicos					5g	
KNO ₃					0,5g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g				0,5g	
MnSO ₄ .H ₂ O					0,5g	
K ₂ HPO ₄	0,5g					
FeSO ₄	0,001g				0,01g	
HPO ₄		2,5				
NaCl		5g	5g		5g	5g
extrato levedura						2g
soy peptona/ bacto soytone				5g		
Tryptona				15g		
Farelo de soja			5g			
Caseína			15g			
Glicose		2g				
amido solúvel					15g	
“Lb-Lemco” powder						1g
infusion brain		12,5g				
infusion hearth		5g				
peptona protease		10g				
caseinato de sódio	2g					
propionato de sódio	4g					
Arginina mono- hidroclorada			1g			
ciclohexamida				0,05g		
Solução Vit. B					1ml	
Ágar	15g	15g	15g	15g	18g	
volume final	1L	1L	1L	1L	1L	1L
pH	8,1	7,4	7,3		7 a 7,4	7,4

4.4.2.Incubação

O crescimento se deu em dispositivos para anaerobiose adaptados, os quais consistem em sacos de EVA selados com um êmbolo para permitir a troca manual de gases. O gás foi retirado com bomba de vácuo para a substituição da atmosfera interior do saco por uma mistura de gases que consiste em 96% N₂, 2% O₂ e 2% CO₂, transformando o ambiente interno do dispositivo em microaerofílico. O dispositivo ainda foi coberto com tecido denso e negro para barrar a irradiação luminosa. Tais medidas foram tomadas para simular as condições às quais os microrganismos do solo estão expostos no subsolo. A incubação se deu por sete dias a 30°C.

As purificações das colônias foram feitas em placas de 150x50mm divididas em 8 partes, em que cada colônia isolada foi alçada e riscada em uma divisão da placa com o mesmo tipo de meio com o qual houve o primeiro isolamento. Tais placas foram mantidas nas mesmas condições de crescimento para obtenção de mais células a fim de seguir com a segunda etapa de purificação. Nesta, a mesma alça com a colônia mais pura fora passada em quatro divisões, havendo diluição das células da colônia. A incubação se deu novamente, como supracitado.

Os isolados purificados foram, então, selecionados segundo a singularidade morfológica. Nesta etapa, reduziu-se o número de isolados que prosseguiram para as etapas que culminaram no sequenciamento.

Após esta etapa, os isolados foram purificados em placas 90x15mm únicas sob a forma de riscos concêntricos tomando toda a placa e diluindo à medida que se preenchia a placa. Uma vez puros, foram transferidos ao meio Nutriente líquido, NB (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) por 24 a 48h sob agitação de 150 rpm à 30°C para obtenção de células suficientes para extração de DNA.

Após o crescimento, foram separados 500µl de suspensão de células para serem misturados a 500µl de glicerol e estocados em freezer -80°C para garantir a integridade das células para futuros usos. Para extração de DNA, foram separados 5 ml de suspensão de células para serem concentradas.

4.4.3. Extração de DNA dos isolados do carvão

A preparação do DNA dos isolados foi realizada de acordo com Stirling (2003), em que as colônias puras retiradas das placas foram inseridas em tubos falcon de 50ml contendo 15 mL de meio nutriente líquido (NB). Foram submetidos à agitação orbital (150 rpm) por 24-48 horas à 32°C. Da suspensão celular, 1,5 mL foram transferidos para microtubos de 1,7 mL e submetidos à centrifugação por 4 minutos, a 14000 rpm, sendo que essa operação se repetiu por três vezes, obtendo-se pellets. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e para romper as células acrescentou-se 400 µL do Tampão A (Composição – suficiente para 50 amostras: 400 µL de Triton X-100; 2 mL de SDS 10%; 400 µL de 5 M NaCl; 200 µL de 1 M Tris-HCl pH = 8,0; 40 µL de 0,5 M EDTA pH=8,0 e 16,960 mL de água ultra-pura esterilizada), 200 mg de pérolas de vidro 0,1 mm, 100 µL de fenol e 100 µL de CIA (24 álcool isoamílico: 1 clorofórmio), sobre agitação horizontal por 3 minutos. Após a agitação, foram adicionados 400 µL de tampão TE (para um volume final de 50 mL: 500 µL de 1M Tris-HCl pH=8,0, 100 µL de 0,5M EDTA pH=8,0 e água ultra-pura) e homogeneizado por inversão de 20 vezes. O material foi centrifugado por 5 minutos à 14000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, sendo adicionado 1 mL de

etanol absoluto, homogeneizado e centrifugado por mais 5 minutos à 14000 rpm. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e acrescentados 400 µL de tampão TE e 10 µL de acetato de amônio a 4M, homogeneizado 20 vezes e adicionado 1mL de etanol absoluto, centrifugado por 5 minutos, à 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado por completo e o precipitado foi submetido à secagem em concentrador de DNA por 10 minutos à 30°C. Após a secagem, foi adicionado ao precipitado 40 µL de Tris-RNase (para um volume final de 10 mL: 100 µL de RNase (10 mg/ mL), 100 µL de 1 M Tris-HCl pH=8,0 e água ultra-pura) e incubado a 37°C durante 30 minutos em banho-maria. A Figura 6 esquematiza esse protocolo de extração de DNA bacteriano.

4.4.4. Amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* e genes *alkB/alkM* e *bph* para sequenciamento

O gene 16S rRNA de *Bacteria* foi amplificado com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio Eubacteria fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG^{-3'}) e rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC^{-3'}) (WEISBURG et. al., 1991). As amplificações do gene 16S rRNA foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 5 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão Taq, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 10 ng de DNA. A reação foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 32 minutos.

Os genes *alk* foram amplificados com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para *alkF* (5' - GCI CAI GAR ITI RKI CAY AA-3') e *alkR* (5' - GCI TGI TGI TCI SWR TGI CGY TG- 3') de Kuhn et al. (2009) realizadas em volume final de 25 µL contendo 5 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão Taq, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 50 ng de DNA. A reação foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 97°C, seguido de 28 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

O gene *bph* foi amplificado com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para BPHDF3 (5'- ACTGGAARTTYGCIGCVGA - 3') e BPHDR (5'- ACCCAGTTYTCICCRTCGTC - 3') de Iwai et al. (2010) realizadas em volume final de 20 µL contendo 5 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 10 X tampão Taq, 50 mM de MgCl₂, 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 50 ng de DNA. A reação foi iniciada com 3 minutos de

desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos, e extensão final a 72°C por 4 minutos.

Uma alíquota de 5 µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de tamanho de DNA, o marcador molecular Low mass (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). A precipitação dos produtos de PCR (25 µL) foi realizada pela adição de isopropanol 100% (60 µL) seguida de incubação por 2 horas à -20°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 25 min, a temperatura ambiente; adicionado 250 µL de etanol 70% e a mistura centrifugada a 14.000 rpm, por 5 min, e seca a 40 °C (bloco aquecedor para microtubos), por 10 min ou no concentrador de DNA por 10 min. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água ultrapura autoclavada e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%, para verificar a qualidade da purificação.

4.4.4.1. Reação de sequenciamento dos genes 16S rRNA, *alkM* e *alkB* e *bph*

A PCR de sequenciamento dos fragmentos de 16S rRNA foi feita em um volume final de 10 µL com 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 1,0 µL de tampão 2,5 X; 3,0 µL de Big Dye Terminator30 Cycle Sequencing v.3 (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos da amplificação anterior (WEISBURG et al., 1991). As condições de amplificação foram: 2 min de desnaturação a 96°C, seguidos de 30 ciclos com desnaturação a 95° C por 20 segundos, anelamento a 55° C por 15 segundos, extensão a 60° C por 1 minuto.

A PCR de sequenciamento dos fragmentos dos genes *alk* foi feita em um volume final de 10 µL com 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 1,0 µL de tampão 2,5 X; 3,0 µL de Big Dye Terminator30 Cycle Sequencing v.3 (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos da amplificação anterior (KUHN et al., 2009). As condições de amplificação foram: 1 min de desnaturação a 96°C, seguidos de 28 ciclos com desnaturação a 95° C por 10 segundos, anelamento a 45° C por 30 segundos, extensão a 60° C por 4 min.

A PCR de sequenciamento dos fragmentos de *bph* foi feita em um volume final de 10 µL com 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 1,0 µL de tampão 2,5 X; 3,0 µL de Big Dye Terminator30 Cycle Sequencing v.3 (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos da amplificação anterior (IWAI et al., 2010). As condições de amplificação foram: 2 min de desnaturação a 96°C, seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 96° C por 45 segundos, anelamento a 60° C por 50 segundos, extensão a 60° C por 4 min.

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação para a eliminação dos dNTPs que não foram incorporados. Foi adicionado 1 µL de tampão acetato de sódio/EDTA, mais 40 µL etanol a 95% (recém preparado). Após a homogeneização por agitação, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min., a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado incubado por 5 min. a 40°C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspensionado em 10 µL de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems) em microplacas. A microplaca foi colocada em um termociclador para desnaturação do DNA a 96°C durante 5 min. e imediatamente colocado no gelo por 2 minutos.

A leitura das bases marcadas foi realizada no Sequenciador Automático ABI Prism 3130 Genetic Analyser do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – CENA/USP, que utiliza eletroforese capilar para separação e detecção dos fragmentos amplificados. A automação deste procedimento permitiu um aumento no número de amostras avaliadas em pequeno intervalo de tempo, e proporcionou uma técnica de análise rápida para avaliar estruturas de comunidades microbianas no nível molecular. A elevada resolução da eletroforese automatizada associada à maior sensibilidade de detecção de fluorescências é altamente mais eficiente em relação aos métodos que utilizam gel vertical. Desta forma, a intensidade das bandas pode ser medida mais precisamente, facilitando a comparação dos perfis de comunidades distintas ou altamente relacionadas (KENT;TRIPLETT, 2002).

4.4.4.2. Construção de árvores filogenéticas

As *reads* geradas foram editadas para obtenção de sequências consenso, removendo as bases menores que 20 (de baixa qualidade) e *contigs* menores que 400pb através do programa Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING;GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998). Os *contigs* do 16S rRNA foram verificados quanto à existência de quimeras no programa DECIPHER'S Find Chimeras, website <<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html>> (WRIGHT et al., 2012). Depois foram comparados em três bancos de dados para maior confiabilidade dos resultados, dado que cada um dos bancos possui critérios diferentes de deposição de informações: no RDP (Ribosomal Database Project) website (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>); no EZTaxon-e website (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>); e no blastn, modo Megablast, do NCBI website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). As sequências foram alinhadas com MUSCLE (EDGAR 2004a; 2004b) e foram construídas árvores filogenéticas no programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011) para comparar os organismos quanto ao gene 16S rRNA contra os mais próximos e bem caracterizados

(type sequences) encontrados na base de dados RDP, além de uma sequência externa para determinar a topologia (outgroup), com dois métodos de relação entre as sequências: *Maximum Likelihood* (ML) e *Maximum Parsimony* (MP), ambos baseados em 1000 de bootstrap (número de análises que origina na maior probabilidade de o agrupamento existir, exibido em porcentagem próximo aos ramos da árvore) com a deleção da terceira base nucleotídica. No ML a história evolucionária inferida é feita pelo modelo de Kimura 2 (KIMURA, 1980), a partir de 30 nucleotídeos consenso do alinhamento se deletando gaps e dados perdidos, após isso uma matriz dos algoritmos do *Neighbor-Join* e BioNJ é formulada e utilizada para análise de distâncias no método *Maximum Composite Likelihood* (MCL) e a árvore ML é a selecionada por ter o maior log de probabilidade do arranjo existir. No MP, pelos algoritmos são produzidas diversas árvores de parcimônia, nas quais a posição que mais se repete é considerada a consenso e uma árvore final é criada (KUMAR, 2000).

Ao mesmo tempo, as sequências dos genes *alk* e *bph* foram analisadas pelo Fungene Pipeline (<<http://fungene.cme.msu.edu/index.spr>>) quanto à existência de quimeras, diversidade, transformação em aminoácidos e obtenção de sequências referência. Após foram verificadas quanto às ORFs no ORF Finder, website <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>>. O alinhamento com MUSCLE (EDGAR 2004a; 2004b) e construção de árvores filogenéticas ocorreu no programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011) para comparar os organismos quanto às especificidades dos genes *alkB* e *alkM* e do *bph* com dois métodos de relação entre as sequências de aminoácidos: *Maximum Likelihood* (ML) e *Maximum Parsimony* (MP), ambos baseados em 1000 de bootstrap. No ML a história evolucionária inferida é feita pelo modelo de Jones-Taylor-Thornton et al. (JTT) (1992). No MP, pelos algoritmos são produzidas diversas árvores de parcimônia, nas quais a posição que mais se repete é considerada a consenso e uma árvore final é criada (KUMAR, 2000).

4.5. Bioensaio de degradação de n-alcenos e hidrocarbonetos aromáticos

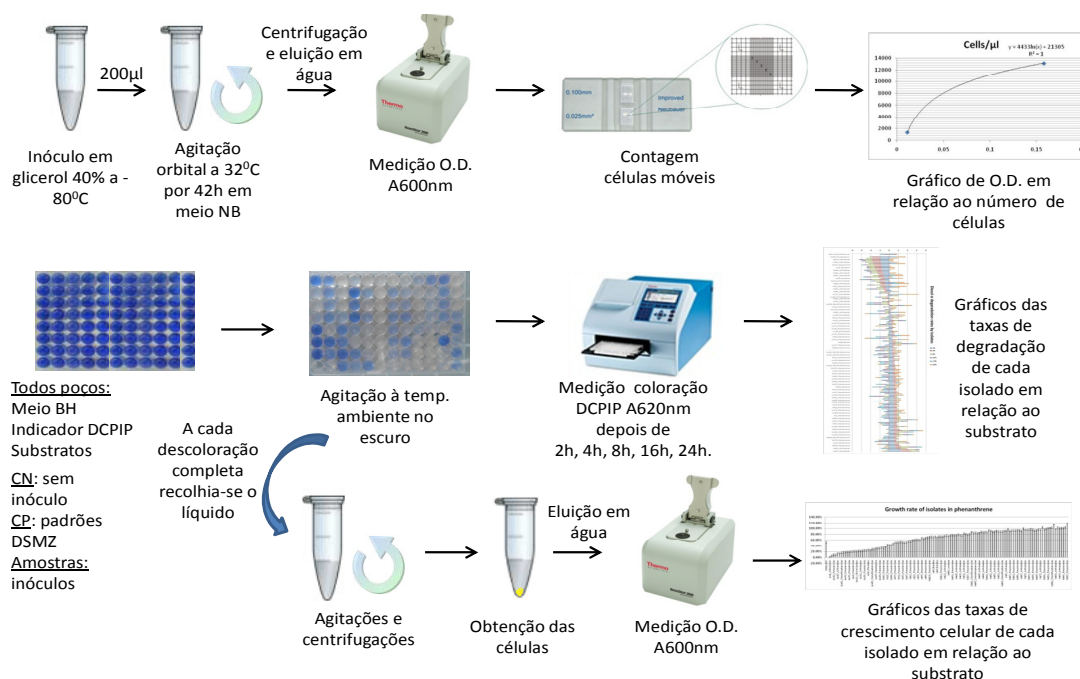


Figura 14 -Visão global do protocolo do bioensaio de degradação de n-alcenos e hidrocarbonetos aromáticos por células bacterianas isoladas de TPAs

Para avaliar a eficiência da biodegradação dos substratos pelos isolados obtidos, bioensaios foram realizados como descrito por Hanson et al. (1993) e baseia-se na aplicação do indicador redox DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) à solução contendo os substratos alvo. Os bioensaios foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços com controles positivos e negativos em triplicata junto aos isolados portadores dos genes *alkB* e *alkM* em triplicata para avaliação de sua capacidade degradativa de n-alcenos; e com os isolados totais em triplicata para avaliação se os mesmos possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos.

Para o bioensaio de hidrocarbonetos aromáticos foram utilizados os substratos fenantreno (98% de pureza, Sigma Aldrich) de massa molecular 178,23 g/mol diluído em etanol e filtrado em membrana de 0,22 µm, uma substância pura para um bioensaio controlado; bifenil (99,5%, Sigma Aldrich, St Louis, MO) de massa molecular de 154,21 g/mol diluído em etanol e filtrado em membrana de 0,22 µm, uma substância pura para um bioensaio controlado; e o óleo diesel (3% de pureza, comum comercializado nos postos de combustíveis brasileiros) diluído em água ultrapura e filtrado em membrana de 0,22 µm, como uma possível aplicação.

Este ensaio é baseado no princípio da descoloração do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) (Sigma Aldrich, St Louis, MO) de massa molecular 326,11 g/mol. O DCPIP foi diluído em água ultrapura a 100% e filtrado a 0,22 µm e foi

utilizado 0,2% do volume final (4µl). Este indicador atua como uma avaliação indireta de degradação, em que quando elétrons são liberados no ambiente pela atividade enzimática das células degradadoras dos substratos, este indicador é reduzido e sua conformação estrutural se modifica acabando por refletir diferentemente a luz, mudando do estado oxidado azul para o estado reduzido incolor.

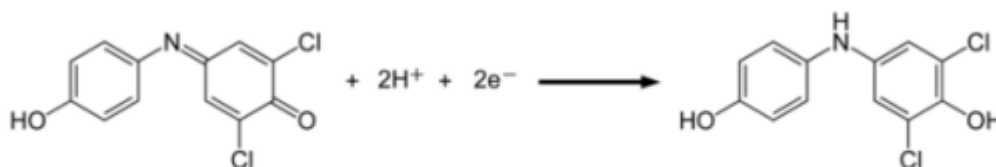


Figura 15 -Processo de redução do DCPIP

O uso de padrões é fundamental para a robustez dos resultados de um experimento laboratorial. Os controles positivos utilizados foram os isolados contidos na Tabela 3: DSMZ 6899 - *Pseudomonas putida*, DSM 11192 - *Gordonia* sp., DSM 6612 - *Arthrobacter oxydans*, todos obtidos do banco de culturas celulares DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, <http://www.dsmz.de/index.htm>). Já os controles negativos consistiram apenas dos meios BH, substratos, meio NB sem inoculantes e o indicador DCPIP.

Tabela 3 - Padrões positivos utilizados para o bioensaio de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e para as caracterizações genéticas

No. DSMZ	Microrganismo	Metabolismo de hidrocarbonetos: fonte de carbono e energia	Degradação positiva	Tempo degradação
DSM 6899	<i>Pseudomonas putida</i>	m-cresol, o-cresol, p-xileno, tolueno, nitrotoluenos, 2-clorotolueno, benzenos clorinados, fenóis, tri- e dichloroetilenos	Fenantreno	24h
			Óleo diesel	24h
			Bifenil	16h
DSM 11192	<i>Gordonia</i> sp.	n-alcano, naftaleno, tolueno, m-xileno, p-xileno	Fenantreno	16h
			Óleo diesel	16h
			Bifenil	24h
DSM 6612	<i>Arthrobacter oxydans</i>	hexadecano, hexano, ác.bromobenzóico, ác. 4-clorobenzóico	Bifenil	24h

4.5.1. Densidade de células

Para se avaliar igualmente a atividade dos isolados, utiliza-se de uma quantidade padrão de inóculo para os bioensaios, no caso 10^8 - 10^9 células por ml (cél/mL), medidos por contagem celular de células móveis sob microscópio óptico a 1000X (Bel Photonics, Osasco,

Brazil) com câmara de Neubauer (Boeco, Hamburg, Germany) e espectrofotometria em Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, West Palm Beach, United States) no comprimento de onda de 600nm. Os isolados mantidos em glicerol 40% a -80°C foram transferidos na quantidade de 200µl para tubos de 1,5ml contendo meio Nutriente líquido, NB, (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) e incubados sob agitação de 180 rpm a 32°C por 42h. Devido a diferentes morfologias, tamanhos celulares e colorações, os isolados foram identificados segundo essas características no meio líquido, aliado às identificações moleculares quanto ao gênero e espécies (em alguns casos) pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Assim, 24 isolados foram escolhidos para servirem de modelos às avaliações de densidade óptica e contagem de células de acordo com Lelliott e Stead (1987), sendo construídos gráficos relacionando o número de células com os valores de O.D. de cada um dos 24 modelos. Cada um dos 85 isolados tiveram sua O.D. medida e cálculos com a função do gráfico do organismo modelo correspondente foram feitas e se obteve uma quantidade final de meio que contivesse o número de células necessárias ao experimento. O volume final de inoculantes variou de 4-50µl.

4.5.2. Pré-teste de padrões, concentrações e co-fator

Um pré-teste foi feito com diferentes diluições de cada substrato, segundo seu peso molecular, e seus respectivos controles positivos. As melhores concentrações, ou a menor inibição, para cada substrato encontrada para todos os controles positivos por categoria estão na Tabela 4.

Tabela 4 -Concentrações testadas em pré-teste com todos os controles positivos e a melhor concentração de cada substrato para todos os controles para degradação de hidrocarbonetos aromáticos

Substrato	Menor inibição
Bifenil (154,21 g/mol)	0,05% (2µl)
Fenantreno (178,23 g/mol)	0,05% (2µl)
Diesel (3% de pureza)	8% (32µl)

4.5.3. Teste de biodegradação com os isolados

Finalmente, depois do volume de células, substratos e indicador DCPIP, o meio mínimo utilizado para completar 200µl dos poços foi o Bushnell-Hass (BH, Difco, Detroit, Estados Unidos), composto por(g/L): MgSO_4 : 0,2; CaCl_2 : 0,02; KH_2PO_4 : 1,0; K_2HPO_4 : 1,0; NH_4NO_3 : 1,0; FeCl_3 : 0,05.

As microplacas foram mantidas no escuro sob temperatura ambiente (18°C) e agitação orbital de 170 rpm. Medições foram feitas a 2h, 4h, 8h, 16 e 24h depois do começo do experimento em espectrofotômetro Multiskan FC, (Thermo Scientific, West palm Beach, United States) com módulo de agitação antes das leituras a 620nm, que captura o azul do DCPIP como um cromóforo. Uma vez que a medida de absorbância é uma relação inversa da taxa de degradação, os dados foram normalizados por meio de subtração de 1 e a taxas foram obtidas em relação à absorbância dos controles negativos. Deste modo, taxas negativas indicadas por gráficos de colunas se referem à baixa captação de cromóforos, indicando atividade positiva de degradação do substrato pelos isolados e padrões positivos.

Após verificação de total descoloração do DCPIP, os conteúdos dos poços foram retirados e centrifugados a 14.000 rpm por 1 min para obtenção das células. Estas foram diluídas em água ultrapura na quantidade de 200µl e foram submetidas a espectrofotometria a 600nm para averiguação da O.D. e inferência do crescimento celular durante o processo de biodegradação de cada substrato. O controle negativo para as medições em espectrofotometria foi realizado pelo mesmo procedimento utilizando os controles negativos das placas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises físicas e químicas do solo

As propriedades do solo possuem um importante papel na fertilidade, por influenciar a nutrição da biota. Como já dito anteriormente, uma alta concentração de matéria orgânica leva à formação de húmus pela decomposição natural e dentre seus componentes mais importantes estão os ácidos húmicos (AH), que também podem vir de MO pirolisada. Tais AH atuam na elevação das trocas catiônicas (CTC) e na diminuição do pH, o que, juntamente com outros fatores bióticos, evitam a lixiviação e influenciam positivamente na ciclagem dos nutrientes no solo.

Comparando-se as áreas quanto aos componentes físico-químicos da Tabela 5: a) em relação ao pH, todos os solos de TPA apresentam pH ácido variando de 5,3-6,5, enquanto que o solo adjacente possui acidez mais elevada em 3,9; b) os nutrientes em geral são mais abundantes nos solos de TPA, como no caso do fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), porém com variações dentro dos solos de TPA, como o potássio (K), havendo áreas com quantidade semelhante ao solo adjacente; d) o teor de alumínio disponível (Al) no solo adjacente é muito maior em relação a todos os solos de TPA, chegando à situação de toxicidade por alumínio; e) a matéria orgânica (MO) é alta em todos os solos de TPA em detrimento do solo adjacente; f) a acidez potencial (H+Al) é semelhante a todos os solos, porém o teor de bases trocáveis (SB) e capacidade de troca catiônica (CTC) são muito maiores nos solos de TPA em relação ao solo adjacente.

As diferentes concentrações e organizações das partículas do solo influenciam na infiltração da água e retenção de nutrientes. Partículas de argila tendem a formar aglomerados com a MOS, o que propicia uma maior retenção de nutrientes no mesmo, como é visto nas análises químicas (Tabela 5).

O pH mais elevado das TPAs leva a uma diminuição do alumínio disponível, porém maior disponibilidade de Ca e Mg (EMBRAPA, 2011). Valores elevados de SB (RONQUIM, 2010) e de CTC (GLASER et al., 2002) indicam solos como férteis por tais fatores reduzirem a lixiviação de nutrientes. Assim, os maiores teores de nutrientes, SB e CTC, em meio a um pH ácido não extremo, são um dos indicativos químicos da capacidade dos solos de TPA de sustentarem alta fertilidade vistos na análise dos solos deste estudo.

Tabela 5 - Atributos químicos e físicos dos solos de Terra Preta de Índio das cinco áreas e uma adjacente

Área	Idade da capoeira	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	M.O	Textura	Dp	Ds	Pt
		H ₂ O	mg/Kg	mmolc/Kg							g/kg		g/cm ³		cm ³ /cm ³
Laguinho	20 anos	5,3	53	0,4	41	10	3	35	51,2	87	29	Média arenosa	2,587	1,33	0,4977
Barroso	40 anos	5,2	751	0,5	48	9	4,5	52	54,7	127,3	41	Média arenosa	2,564	1,29	0,5017
Costa do Açutuba	10 anos	5,6	294	1,2	74	10	6	49	84,4	133,3	40	Média arenosa	2,53	1,17	0,5203
Lago Grande	20 anos	5,7	927	0,6	128	16	<1	51	145,3	196	53	Argilosa	2,496	0,93	0,629
Hatahara Capoeira	12 anos	6,3	927	2,8	166	21	<1	27	187,5	213,9	61	Argilosa	2,523	1,1	0,5598
Hatahara Canavial	12 anos	6,0	964	2,5	129,5	19,5	<1	46	152,7	194,25	53	Argilosa	2,526	1,13	0,5463
Hatahara Pastagem	12 anos	6,0	738	3,1	98	14	<1	49	114,1	161,6	48	Argilosa	2,576	1,3	0,4977
Adjacente	-	3,9	4	0,4	5	1	24	55	2,5	61,1	32	Média argilosa	2,632	1,29	0,5053

P (mg.Kg-1); K, Ca, Mg, Al, H+Al, SB, CTC (mmolc Kg-1); V e m (%). H+Al: Acidez potencial; SB: Soma de bases trocáveis; CTC: Capacidade de troca de cátions; M.O.: Matéria orgânica. Classe de textura: Argila (c/ dispersante) até 149 g/kg = arenosa (ar); de 150 a 249 g/kg = média arenosa (md-ar); de 250 a 349 g/kg = média argilosa (md-arg); de 350 a 599 g/kg = argilosa (arg); de 600 g/kg ou superior - muito argilosa (m-arg). Densidade real (Dr) = Dens. partículas (Dp) - picnometro; Densidade aparente (Da) = Dens. do solo (Ds) - anel volumétrico; Pt= porosidade total.

Atravéz das análises dos solos, podemos considerar áreas mais conservadas e áreas degradadas de TPA. As áreas Lago Grande e Barroso possuem floresta secundária, sendo mais densa que as capoeiras das outras áreas e pelas análises químicas, e não houve diferenças entre florestas secundárias e floresta secundária média mais conservada, como Hatahara, as quais destoam bastante das características do solo adjacente. Já das capoeiras restantes, a do Laguinho se mostra mais degradada., sendo que o solo é o que mais se assemelha às características do solo adjacente, podendo ser devido à profundidade da TPA encontrada será menor de todas as TPAs amostradas neste estudo.

Os solos coletados das diferentes coberturas vegetais da área Hatahara mostram-se não distintos, sendo que os solos com cultivo de cana-de-açúcar e pastagem permaneceram com características químicas muito semelhantes da TPA original. Tal fato pode ser devido ao não uso de fertilizantes no cultivo e à resiliência do ambiente TPA, que com sua mistura de componentes - alta concentração de MO ácidos húmicos em abundância, CTC e SB alta, podendo estar relacionados também à microbiota desses ambientes - propiciam a manutenção da qualidade do solo, ou seja, sua alta fertilidade. Porém, dentre os solos do Hatahara, houve mudança na concentração de Ca e Mg no solo com pastagem em relação aos solos com canavial e capoeira, o que pode ser devido à carreação desses nutrientes através da retirada das gramíneas pelo gado. Vale ressaltar que anteriormente à 12 anos a área era utilizada para cultivo de mamão. Outra observação é a de que os solos com canavial e pastagem apresentam maior acidez potencial que o solo da mesma mancha de TPA com capoeira, o que pode ser explicado por Cunha e colaboradores (2007) que indicam que TPAs cultivadas apresentam maior acidez pela reatividade dos AH, o que favorece a formação ou preservação de grupos funcionais ácidos, sendo possível que os microrganismos que crescem sobre os HPAs sejam mais presentes e ativos em TPAs cultivadas em relação às TPAs com floresta nativa. O que pode ser, então, devido ao revolvimento do solo que propicia a alta mineralização da MO e oxidação.

5.2. Isolamento bacteriano, extração de DNA, amplificação gene 16S rRNA, *alk* e *bph*, sequenciamento e identificação

A partir do biocarvão de sete áreas de Terra Preta de Índio da Amazônia com coberturas vegetais distintas, por meio de cultivo em ambiente microaerofílico em cinco tipos de meios nutritivos, obteve-se 240 isolados bacterianos. Estes foram separados segundo a riqueza morfológica das colônias (forma, tamanho, cor, textura, odor, difusão ou não no meio sólido) e isolados únicos foram destinados aos testes posteriores.

Foi satisfatória a obtenção dos DNAs dos isolados pelo método escolhido, havendo boa quantidade e qualidade. As sequências do gene 16S rRNA de *Bacteria* com tamanhos maiores que 400 pb foram analisadas para a identificação molecular dos isolados e obteve-se

81 isolados identificados. Destes, 6 isolados possuem o gene *alk* para biodegradação de alcanos. Ainda obtivemos 5 isolados com o gene *alk*, porém não foi possível sua identificação molecular devido a 4 não apresentarem sequências da qualidade esperada, havendo necessidade de refazer o sequenciamento, e 1 deles é considerado bactéria não classificada (unclassified bacteria). A identificação dos isolados pode ser observada no Anexo A.

Não houve presença de quimeras nas sequências do gene 16S rRNA. Sendo assim, todas as sequências são isentas de qualquer alteração artificial dos métodos moleculares e os resultados são reflexo das variações existentes na natureza.

Em relação ao número total de isolados antes da seleção morfológica (240), os mesmos se distribuíram nos carvões das áreas de coleta da seguinte forma: 22,50% dos isolados pertencem ao carvão da área Laguinho; 17% ao carvão da Costa do Açutuba; 9,58% ao carvão da Lago Grande; 15% ao carvão da Barroso; 13,75% ao carvão da Hatahara Capoeira; 12,91% ao carvão da Hatahara Canavial e 9,16% ao carvão da Hatahara Pastagem.

Após a seleção morfológica, os isolados finais (86) condisseram com as seguintes proporções pelas áreas de coleta: 19,77% são provenientes do carvão da área Laguinho; 18,60% da Hatahara Pastagem; 18,60% da Costa do Açutuba; 13,95% da Hatahara Canavial; 12,79% da Lago Grande; 11,63% da Barroso; e 4,65% da Hatahara Capoeira. Como já conhecido que o cultivo não condiz com a real diversidade do ambiente, tais valores são somente para caracterizar as abundâncias relativas dos isolados obtidos no estudo.

O biocarvão de TPA é originado da pirólise de diversos materiais orgânicos com variadas proporções de moléculas, como por exemplo a lignocelulose de diferentes plantas; temperaturas; quantidades de oxigênio; tempos de combustão; e influências da própria microbiota nele existente. Deste modo, são gerados fragmentos de carvão com dimensões, porosidade, resistência, bio-óleos, grupos funcionais e, conseqüentemente, microbiotas diferentes aptas a persistir nele. Deste modo, as diferenças na microbiota se devem à natureza do biocarvão e às alterações que este sofreu no solo.

Pode-se observar que o biocarvão da área Laguinho proporcionou o maior número de isolados. Esta área, curiosamente, foi a que mais apresentou características de um solo degradado pelas análises químicas e foi a camada de TPA mais rasa encontrada. Pode ser que os fragmentos de carvão estivessem mais expostos, sendo influenciados pelas alterações de temperatura e umidade, o que pode ter mudado a estrutura da comunidade bacteriana ao forçar a seleção das bactérias mais aptas, que, coincidentemente, são passíveis de cultivo. Foi possível a obtenção de alto número de proteobactérias, já conhecidas por serem muito adaptadas a diversos ambientes; e actinobactérias, já conhecidas por estarem associadas a ambientes secos.

Em todas as áreas foram obtidos isolados identificados como não cultivados, algo esperado por os fragmentos de biocarvão de TPA serem um ambiente restrito e não terem sido estudados pelo método de cultivo. No geral, identificamos uma alta riqueza de gêneros bacterianos, totalizando em 24 gêneros: *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Pantoea*, *Leclercia*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Variovorax*, *Leifsonia*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Parapusiliimonas*, *Bordetella*; *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Rummeliibacillus*; *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*; e *Fibrobacterium*.

Os gêneros *Leclercia*, *Variovorax*, *Bordetella*, *Rumeliibacillus*, *Parapusiliimonas* e *Leifsonia* foram identificados como não-cultivados (uncultured bacteria), que mesmo com sequências de 16S rRNA grandes, apresentam identidade com tais identificações no banco RDP (valores menores de 96%), como também com clones ambientais (sequências obtidas por análises moleculares, sem isolamento bacteriano) do banco NCBI, sendo que no EZTaxon-e as identidades com isolados foram baixas (<45%) (ANEXO A).

O termo *unclassified bacteria* foi utilizado para referenciar o isolado 28B da área Hatahara Pastagem obtido pelo meio BHI, cuja sequência do gene 16S rRNA é parcial com 679pb e não obteve alta similaridade com gêneros do RDP, tampouco com isolados do EZTaxon-e, havendo uma similaridade de 82% com o acesso FQ700280.1 de um clone ambiental do banco NCBI proveniente de ensaio de enriquecimento de solo de Madagascar com minhocas endogênicas deste solo. Salienta-se que o isolado 28B é um dos 11 que possuem o gene *alk*.

Tabela 6 - Proporções relativas dos gêneros bacterianos dos isolados dentre os carvões das áreas de coleta

Filos (% total)	Gêneros (% relativa por área)	Laguinho	Costa do Açutuba	Barroso	Lago Grande	Hatahara Capoeira	Hatahara Pastagem	Hatahara Canavial
<i>Proteobacteria</i> 41,75%	<i>Pseudomonas</i>	22,22%	25,00%				5,88%	20,00%
	<i>Burkholderia</i>	5,56%	25,00%	10,00%			5,88%	6,67%
	<i>Enterobacter</i>	5,56%	16,67%				5,88%	6,67%
	<i>Achromobacter</i>					50,00%		
	<i>Acinetobacter</i>		8,33%		9,09%			6,67%
	<i>Cupriavidus</i>							6,67%
	<i>Pantoea</i>				18,18%			6,67%
	<i>Achromobacter</i>		8,33%				5,88%	
<i>Firmicutes</i> 21,64%	<i>Ralstonia</i>	5,56%					5,88%	
	<i>Paenibacillus</i>				9,09%			
	<i>Lysinibacillus</i>			10,00%				
	<i>Bacillus</i>	16,67%	8,33%	40%	9,09%		29,41%	6,67%
	<i>Brevibacillus</i>	5,56%						
<i>Actinobacteria</i> 12,83%	<i>Paenibacillus</i>			10,00%				6,67%
	<i>Arthrobacter</i>	16,67%		10,00%	27,27%	16,67%	5,88%	
	<i>Rhodococcus</i>							6,67%
<i>Bacteroidetes</i> 0,84%	<i>Streptomyces</i>							6,67%
	<i>Flavobacterium</i>						5,88%	
22,10%	Uncultured bacteria	22,22%	8,33%	20%	27,27%	33,33%	23,53%	20,00%
0,84%	Unclassified bacteria						5,88%	

Os gêneros identificados correspondem a basicamente quatro filos bacterianos: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. Os três primeiros incluem milhares de representantes e correspondem de 90 a 95% de todas as espécies bacterianas conhecidas atualmente (NUNES, 2006). Todos os filos apresentados foram anteriormente descritos nas bioprospecções realizadas em solos e em biocarvão de TPA (NAVARRETE et al., 2010; CANNAVAN, 2011; GERMANO, 2011). Porém, nas análises estritamente moleculares, os filos *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* e *Nitrospira* também foram encontrados, o que não foi possível no método de cultivo. Em relação à riqueza de filos e gêneros dos isolados selecionados e identificados (Tabela 6), pode-se observar que a área Hatahara Canavial mostrou maior riqueza de gêneros bacterianos. Porém, foi a Hatahara Pastagem que mais proporcionou variedade de filos bacterianos, havendo o aparecimento do único isolado pertencente ao filo *Bacteroidetes*. Este filo foi constatado como um dos menos abundantes nas análises estritamente moleculares (NAVARRETE et al., 2010). Tal fato pode ser devido à natureza do carvão amostrado ser diferente, que pode propiciar distintas abundâncias de filos bacterianos, como supracitado. Assim, pode ser que o carvão amostrado

seja um microhabitat diferente do já estudado pelos pesquisadores citados e o filo *Bacteroidetes* seja mais abundante no material do presente estudo, sendo possível seu isolamento. Ou que o método de cultivo escolhido pode ter beneficiado esta bactéria, que mesmo pouco abundante pode ter encontrado um meio para melhor se desenvolver.

A identificação no banco EZTaxon-e mostrou que a grande maioria das sequências de nucleotídeos do gene 16S ribossomal se assemelham com a de isolados de áreas contaminadas, bem como de bioensaios de degradação com hidrocarbonetos aromáticos. Isto demonstra a confiabilidade e a acurácia do método de cultivo no isolamento de microrganismos com potencial para biodegradação a partir do biocarvão de TPA. Assim, os fragmentos de carvão são um dos compartimentos dos solos de TPA que corresponde a um *hotspot* de diversidade microbiana em relação a processos metabólicos funcionais, que pode explicar em parte a constatação de estudos anteriores (TSAI et al., 2003; GERMANO et al., 2012).

Tal fato se confirma em nossos bioensaios com hidrocarbonetos aromáticos representados pelos substratos fenantreno, óleo diesel e bifenil.

O filo *Proteobacteria* é considerado o maior e mais diverso, apresentando grande diversidade morfológica e metabólica. A dominância ocorre em solos cultivados (NUSSLEIN; TIEDJE, 1999) e solos contaminados com metais pesados (SANDAA; TORSVIK; ENGER, 2001), que em geral apresentam pH alto em relação aos solos de floresta. O gênero *Pseudomonas* foi dentre os mais presentes entre os isolados do biocarvão, estando altamente adaptadas e distribuídas nos ambientes (MA; WANG; SHAO, 2006), e são fortemente relacionadas à biodegradação de hidrocarbonetos (LEAHY; COLWELL, 1990). Também são relacionadas com a degradação de hidrocarbonetos de diversas complexidades: *Achromobacter* e *Acinetobacter* (LEAHY; COLWELL, 1990); *Azomonas* (PIEPER, 2005); *Burkholderia* (DUA et al., 2002); *Ralstonia* e *Cupriavidus* (WITZIG et al., 2006); *Pantoea* é considerada promotora de crescimento de plantas e auxilia na fitorremediação de óleo diesel, e degradadora de alcanos (TARA et al., 2014), *Leclercia* (SARMA et al., 2004); *Enterobacter* (KHORASANI et al., 2013); *Variovorax* (HUPERT-KOCUREK et al., 2013); *Serpens* degradadora de alcanos (PERRIELLO, 2000); *Parapusillimonas* (SUN et al., 2013) e *Leifsonia* (VAZ-MOREIRA et al., 2008).

Actinobacteria é um filo de gram-positivas, aeróbicas e anaeróbicas, com alto conteúdo G+C em seu DNA e possui espécies de forma livre na água e em associação a plantas e animais de forma benéfica ou patogênica. São também organismos de metabolismo versátil, que possuem importante função na decomposição da matéria orgânica e na formação do húmus (GOODFELOW; WILLIAMS, 1983), além da notável produção de antimicrobianos que segundo Lancini e Lorenzetti (1993) contribuíram com 6000 antibióticos. Muitos gêneros apresentam interesse industrial, como *Arthrobacter*, *Rhodococcus* and

Gordonia, que estão associados à degradação de hidrocarbonetos saturados e aromáticos (JUHAZ; NAIDU, 2000; PATHAK, 2013; MUTNURI; VASUDEVAN; KAESTNER, 2005), além de *Streptomyces* (BROSSI et al., 2014). Este último, ainda possui grande participação na geração de antimicrobianos, fazendo parte do fornecimento de cerca de 75% dos antibióticos produzidos por actinobactérias (LANCINI; LORENZETTI, 1993). *Renibacterium* são conhecidas por produzirem biosurfactantes, compostos associados à mobilidade, como também facilitadores da aquisição do substrato na degradação (CHRISTOVA et al., 2004).

O filo *Firmicutes* é de bactérias gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas, com baixo conteúdo G+C e possuem hetero e homofermentações e respiração. *Bacillus* e *Paenibacillus* ainda são descritos por serem degradadores de hidrocarbonetos aromáticos (LEAHY; COLWELL, 1990; PIEPER, 2005; DAANE et al., 2001).

Pode-se notar que o isolamento microaerofílico resultou em *Bacillus* spp., o qual foi um dos mais abundantes em anaerobiose facultativa, sendo um dado a acrescentar às características do gênero em questão por tal fato não ter sido muito documentado na literatura.

Bacteroidetes compreendem bactérias gram-negativas, estritamente aeróbias a estritamente anaeróbicas e estão amplamente distribuídas nos ambientes como solo, sedimentos, ambiente marinho, e ainda em simbiose na pele e aparelho digestivo de animais, sendo capazes de degradar quitinas, celulose e hidrocarbonetos aromáticos (SHAH, 1992). O gênero *Flavobacterium* fora citado por Leahy e Colwell em 1990 por fazer parte, juntamente com outras bactérias, como os mais citados em estudos de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos.

Em relação às abundâncias relativas da riqueza morfológica dos isolados bacterianos obtidos dos cinco meios de cultivo, os melhores meios foram: GA com 34,88% dos isolados; ES com 24,42%; AIA com 20,93%; BHI com 16,28%; e TSA com 3,49%.

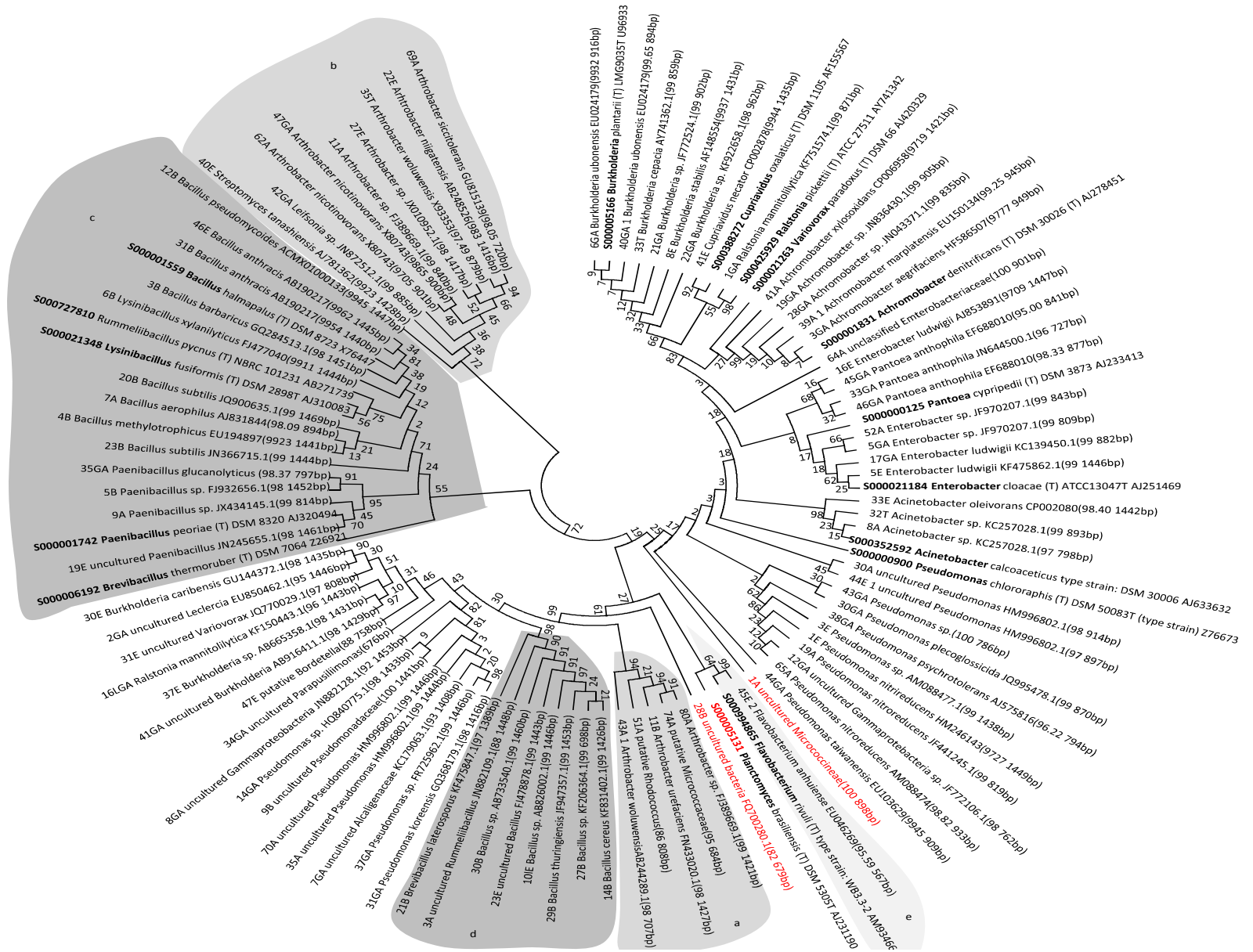
5.2.1. Análise filogenética gene 16S rRNA

Nas análises filogenéticas do gene 16S rRNA no método de *Maximum Likelihood* (ML) (Figura 16) e no *Maximum Parsimony* (MP) (Figura 17) foram observados agrupamentos satisfatórios de muitos isolados com suas respectivas sequências referência internas, sendo que no filo *Proteobacteria* todos os agrupamentos contiveram sequências referência, assim como o (c) da árvore MP que se divide em (c1) e (c2) na ML com grupos que abrangem o filo *Firmicutes* juntamente a sequências referência internas.

Por outro lado, ocorreram grupos exclusivos de sequências de isolados sustentados por altos valores de bootstrap das sequências referência (a) e (b) mostram grupos exclusivos de isolados do filo *Actinobacteria* sustentado nos dois métodos filogenéticos utilizados; já o (d) nas duas árvores mostra agrupamento exclusivo de isolados do biocarvão do filo *Firmicutes*.

Tal fato pode ser devido a uma variação intrínseca no DNA bacteriano de isolados do biocarvão de TPA. Germano et al. (2012) observaram grupos de sequências de genes de subunidades alfa de dioxigenases aromáticas compostos unicamente de sequências oriundas da TPA, em detrimento das referências obtidas de outros ambientes. Deste modo, pode haver uma variação genética determinante nas bactérias dos solos e carvão de TPA.

Já as sequências de isolados em vermelho possuem identificação indefinida (uncultured e unclassified) e se mostram não agrupadas por apresentarem posições diferentes e não se pode chegar a um consenso. Todo este quadro pode ser devido ao seu tamanho reduzido, havendo a necessidade de sequenciamento com primers internos do gene 16S rRNA bacteriano para melhor esclarecimento de suas identidades.



5.2.2. Amplificação do gene *alk* e *bph*, sequenciamento e identificação

Quanto ao gene *bph*, não houve isolados detentores deste gene, porém isso não significa que os isolados não tenham capacidade de degradar substratos aromáticos, e até alcanos, por os plasmídeos poderem carregar muitos genes funcionais e produzirem diversas enzimas com capacidade de degradar substratos diferentes. Além de homologias existentes entre os genes, em que apenas algumas partes se modificam e levam à geração de enzimas diferentes (PARK; CROWLEY, 2006). Na literatura existem descrições da presença de plasmídeo envolvido na degradação de alcanos, clorobifenilos (PCBs), naftaleno, tolueno, xileno, toluato, etilbenzeno e outros compostos. Tal capacidade pode ser derivada da transferência horizontal de genes (THG), em que os plasmídeos constituem uma forma de DNA altamente transferível via conjugação ou transformação (LEAHY; COLWELL, 1990) e a THG pode levar à totalidade dos indivíduos de determinada população, ou mesmo de uma comunidade bacteriana, a aquisição das informações contidas no plasmídeo inicial (PARK; CROWLEY, 2006), expandindo o potencial metabólico para outros membros de um ecossistema.

Foi prospectado no estudo também o gene *alk*, mais propriamente as regiões *alkB* até a *alkM*. O gene *alkB* sintetiza a enzima *alkane monooxygenase* (AlkB), que é a enzima que contém 2 átomos de ferro ligados por 8 histidinas localizada na membrana bacteriana (VAN BELIEN et al., 2005), e o gene *alkM* sintetiza as *alkane hydroxylases* terminais (AlkM). Ambos fazem parte do sistema *alkane omega-hydroxylase* (ALKB), o qual é responsável pela oxidação inicial de alcanos, e é composto por 3 componentes: *NADH-rebredoxin reductase* (AlkT), uma *rubredoxin* solúvel (AlkG) e a enzima integral da membrana bacteriana (AlkB). Ainda incluem-se no sistema ALKB a *terminal alkane hydroxylase* (AlkM), *xylene monooxygenase/hydroxylases* (XylM), *p-cymene monooxygenase hydroxylases* (CymAa) e outras proteínas relacionadas. O sistema ALKB possui regiões hidrofóbicas extensas, fazendo parte da membrana plasmática bacteriana, e utiliza ferro e oxigênio para clivar ligações C-H de alcanos (SHANKLIN et al., 1997), convertendo esse substrato em acil CoA.

Obtivemos 11 isolados detentores do gene *alk*. Observamos que as sequências não são quimeras, sendo assim, todas as sequências são isentas de qualquer alteração artificial dos métodos moleculares e os resultados são reflexo das variações existentes na natureza. Porém, possuem códons de parada, havendo ao menos três *open reading frames* (ORFs) sendo sequências não codificáveis por completo, observadas pela análise no ORF Finder. Estes podem ter surgido de mutações de inserção ou deleção de nucleotídeos das sequências gênicas codificáveis. Cerca de 80% do DNA bacteriano é codificável (KUO; MORAN; OCHMAN, 2009), porém estudos observaram que genomas bacterianos possuem genes partidos ou interrompidos, os quais são codificáveis em outros genomas bacterianos relacionados (ANDERSSON; ANDERSSON, 2011; KARRO et al., 2007) e podem chegar a compreender

mais que 50% do genoma bacteriano (TOH et al., 2006). Apesar de as sequências não serem inteiramente codificáveis, suas ORFs apresentam alta similaridade com as existentes no NCBI pela identificação no blastp. As identificações do tblastx das sequências inteiras está na Tabela 7, e das ORFs no blastp estão no Anexo B.

Exceto o isolado 9A_*Paenibacillus*_sp._JX434145.1(99%_814bp)(Lago Grande/AIA) que é possuidor do gene *alkM*, cujo produto seria a *terminal alkane hydroxylase*, a maioria dos isolados (90,90%) possui homologia com sequências do gene *alkB* cujo produto seria a *alkane monooxygenase*. Muitas ORFs foram similares à família protéica de *fatty acid desaturase*, a qual é estruturalmente relacionada ao sistema ALKB (SHANKLIN; WHITE; FOX, 1994).

Em adição, a maioria dos isolados com gene *alkB* (63,63%) é similar à sequências de clones ambientais, ou seja, tais genes não foram obtidos de isolados bacterianos conhecidos e cultivados. Sendo assim, obtivemos isolados com sequências do gene *alk* ainda não estudadas de seus organismos portadores. E afirmamos que os portadores verificados neste estudo são bactérias do filo *Actinobacteria* representado por *Arthrobacter woluwensis* (isolado 35T proveniente da Costa do Açutuba); do filo *Firmicutes* representado por *Paenibacillus* sp. (9A proveniente da Lago Grande) e do filo *Proteobacteria* representado pelos isolados *Acinetobacter* sp. (isolados 32T da Costa do Açutuba e 8A da Lago Grande), *Pseudomonas plecoglossicida* (isolado 30GA da Hatahara Canavial) e *Pseudomonas* sp. (isolado 3E da Costa do Açutuba).

Ainda houve uma bactéria não cultivada e não identificada detentora do gene *alk*(isolado 28B da Hatahara Pastagem). Os outros quatro isolados não possuem identificação, sendo 3 provenientes da Costa do Açutuba (isolados 2E, 2A, 20A) e 1 da Laguinho (isolado 16GA).

Apesar das sequências possuírem várias ORFs, nas construções filogenéticas ocorre a deleção parcial de gaps, havendo comparação de sequências igualmente íntegras. Assim, nas análises filogenéticas com as sequências referência do gene *alk* do banco Fungene (Figuras 19 e 20), observamos que as nossas sequências possuem homologias com as externas como indicado por (c) e (d), cujo agrupamento se repete nos dois métodos utilizados. Além disso, um agrupamento exclusivo de sequências parciais do gene *alk* (sequências forward somente) de dois isolados, representado por (a), se repetem possivelmente pelo tamanho diferenciado destas sequências em relação às demais. Porém, o agrupamento (b) é exclusivo de sequências completas de gene *alk* de isolados sustentados pelas duas árvores.

Portanto, houve a presença do gene para degradação de alcanos de biocarvão de áreas de TPA com capoeira e com cultivo e indica que existem bactérias possivelmente degradadoras de lignocelulose no biocarvão de TPA.

Tabela 7 - Identificação das sequências do gene *alk*

Isolados	Seq. (pb)	N.Acesso	Descrição	Sim.	E-value
35T_Arthrobacter_woluwensis_X93353(97.49%_879bp)(C.Açutuba/TSA) alkB	498	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	95%	7,00E-69
32T_Acinetobacter_sp._KC257028.1(99%_893bp)(C.Açutuba/TSA) alkB	423	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	99%	2,00E-74
30GA_Pseudomonas_plecoglosicida_JQ995478.1(99%_870bp)(H.Canavial/GA) alk	465	HQ685899.1	Acinetobacter radioresistens strain S13 alkane hydroxylase B gene, complete cds	99%	3,00E-87
8A_Acinetobacter_sp._KC257028.1(97%_798bp)(Lago Grande/AIA) alkB	504	JX171313.1	Uncultured bacterium clone P1A03_GMR alkane-hydroxylase (alkB) gene, partial cds	89%	1,00E-68
3E_Pseudomonas_sp._AM088477.1(99%_1438bp)(C.Açutuba/ES) alk	543	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	99%	1,00E-123
16GA(Laguinho/GA)alkB	541	JN616316.1	Bacillus sp. MS238f alkane-1-monooxygenase (alkB1) gene, partial cds	99%	7,00E-120
2E (C.Açutuba/ES) alkB	523	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	87%	1,00E-89
20A (C.Açutuba/AIA)alkB	549	JQ622394.1	Acinetobacter sp. SJ-15 alkane monooxygenase gene, partial cds	97%	2,00E-77
9A_Paenibacillus_sp._JX434145.1(99%_814bp) (Lago Grande/AIA) alkM	299	AJ009585.1	Acinetobacter sp. alkM gene, partial	93%	6,00E-40
28B_uncultured_bacteria_FQ700280.1(82%_679bp)(H.Pastagem/BHI) alkB	286	HG530430.1	Uncultured bacterium partial alkB gene for alkane monooxygenase, clone TGLR-4	95%	2,00E-36
2A (C.Açutuba/ES) alkB	581	KF177290.1	Uncultured bacterium clone B4 putative alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	93%	7,00E-118

Os isolados portadores de genes *alk* estão apresentados pelo nome do isolado, identificação molecular, número de acesso à sequência similar e porcentagem de similaridade com a identificação, seguido da área de coleta de onde provém e o meio de cultivo pelo qual foi isolado. AIA - Actinomycetes Isolation Agar; BHI - Brain-Heart Infusion Agar; ES - Extrato de solo de TPA; GA- Agar de Wageningen; TSA- Trypticase Soy Agar. São ainda apresentados os tamanhos das sequências do gene *alk*, os números de acesso, porcentagem de similaridade e descrição das sequências similares. As sequências completas foram identificadas pelo método tblastx contra do banco de dados NCBI.

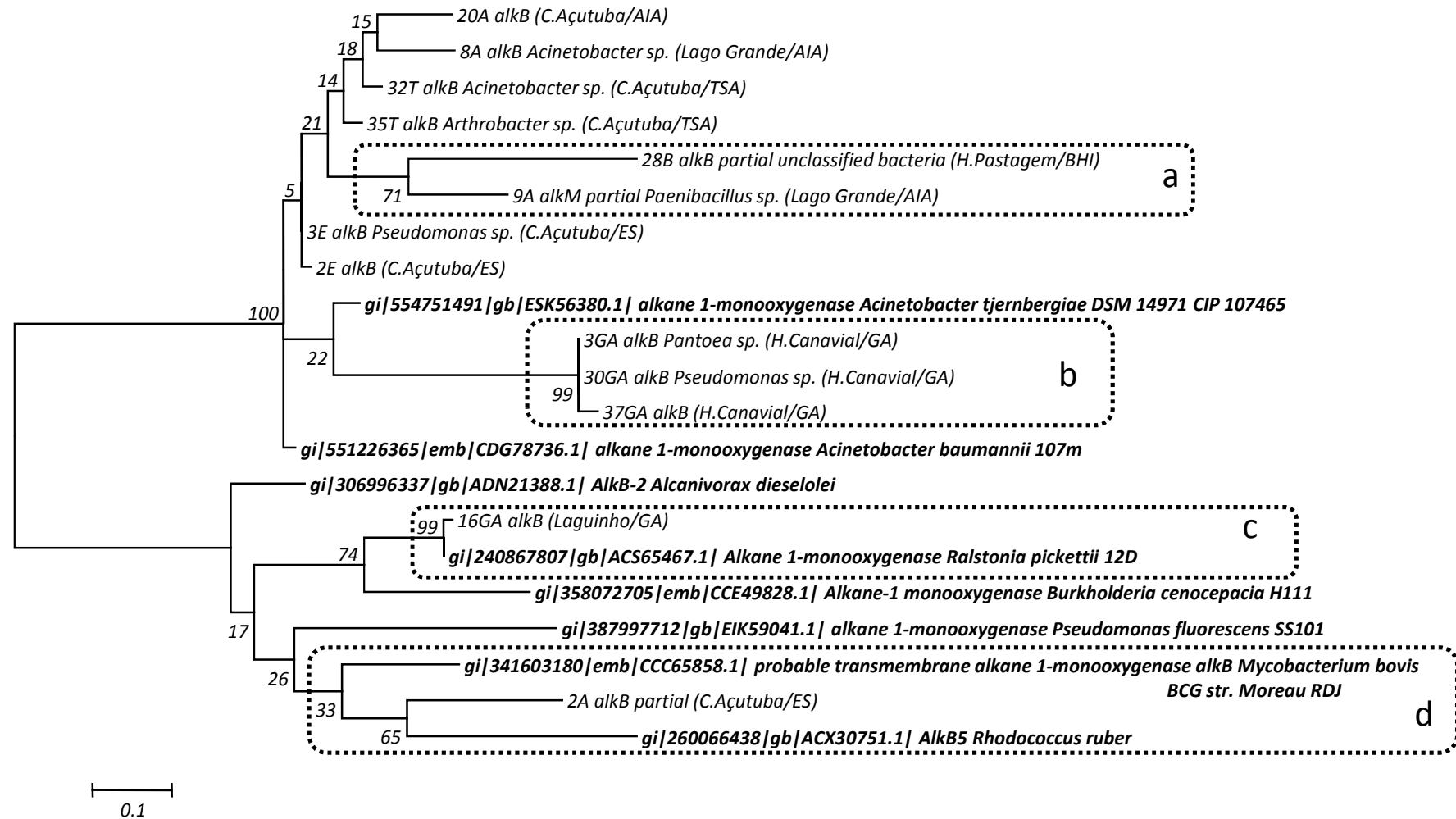


Figura 18 -Relações das sequências de aminoácidos do gene *alk* dos isolados com sequências internas pelo método de *Maximum Likelihood Tree* (ML) com 1000 de *bootstrap* e modelo de distância evolutiva de Jones-Taylor-Thornton (JTT) realizada no programa MEGA 5 (TAMURA, 2011)

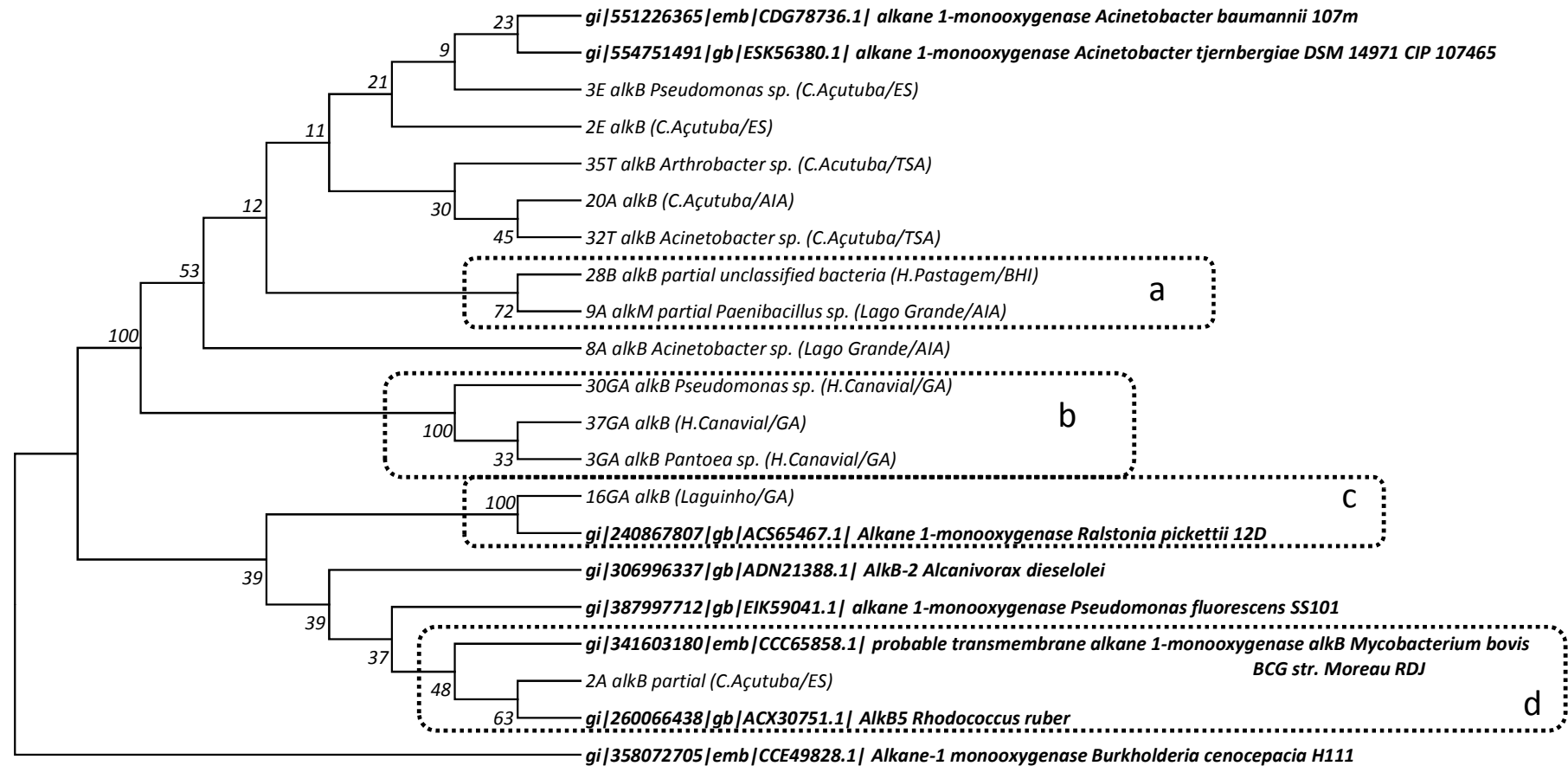


Figura 19 -Relações das sequências de aminoácidos do gene *alk* dos isolados com sequências internas pelo método de *Maximum Parsimony Tree* (MP) com 1000 de *bootstrap* realizada no programa MEGA 5 (TAMURA, 2011)

Tendo por base de que as construções filogenéticas são feitas para observar a homologia, isto é, o ancestral comum das sequências (HALL, 2013), podemos observar que possivelmente as sequências completas dos genes agrupados em (b) possuem peculiaridades intrínsecas ao microambiente do biocarvão de TPA, cuja evolução pode ter ocorrido de forma diferente das de outros ambientes. Tal fato já é conhecido por a biodegradação ser um mecanismo de adaptação para a sobrevivência bacteriana, uma vez que a transferência de genes e a mutação (inserção, deleção ou inversão) são essenciais para o metabolismo de diferentes compostos de carbono (BARKAY; PRITCHARD, 1988; SPAIN; VAN VELD, 1983).

Tais agrupamentos exclusivos de sequências de isolados nas árvores filogenéticas se repetiram nos genes 16S ribossomal bacteriano (Figuras 16 e 17) e gene *alk* (Figuras 18 e 19).

5.3. Bioensaio de degradação de n-alcanos e hidrocarbonetos aromáticos

É importante demonstrar a habilidade de biodegradação por meio de condições controladas, o que requer avaliações laboratoriais para verificação da eficácia da biodegradação (ATLAS, 1995). A intenção foi a obtenção de isolados com funções industriais que possam ser utilizados no futuro da biorremediação de áreas contaminadas com esses poluentes, além de otimizar processos industriais, como a fabricação de papel e biocombustíveis. Neste trabalho verificou-se a capacidade positiva ou negativa de degradação por parte dos isolados, bem como a taxa de crescimento celular na biodegradação dos diferentes substratos.

Pela avaliação da descoloração completa do indicador redox DCPIP, observamos que 53,49% de isolados foram positivos para a degradação de 0,05% de fenantreno; 70,93% de isolados foram positivos para a degradação de 8% de óleo diesel; e 88,37% dos isolados foram positivos para degradação de 0,05% de bifenil. Cerca de 16,27% (14) dos isolados degradou um único substrato, principalmente o bifenil. Houve isolados com capacidade de degradar dois substratos, 30,23% (26 isolados); e até mesmo os três substratos estudados, 46,51% (40 isolados) (Tabela 8).

Tabela 8 - Identificação dos isolados positivos nos bioensaios de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos

Isolados	Bifenil	Diesel	Fenantreno
DSM6899 <i>Pseudomonas putida</i>	16h	24h	24h
DSM11192 <i>Gordonia</i> sp.	24h	16h	16h
DSM6612 <i>Arthrobacter oxydans</i>	24h		
10IE <i>Bacillus</i> sp._AB826002.1(99%_1446bp)(Laguinho/ES) alk	24h	16h	24h
11A <i>Arthrobacter</i> sp._FJ389669.1(99%_840bp)(Lago Grande/AIA)	16h		
11B <i>Arthrobacter urefaciens</i> _FN433020.1(98%_1427bp)(H.Capoeira/BHI)	16h	16h	
12B <i>Bacillus pseudomyoides</i> _ACMX01000133(99,45%_1447bp)(Barroso/BHI)	16h	2h	
12GA <i>uncultured</i> _Gammaproteobacteria sp._JF772106.1(98%_762bp)(Laguinho/GA)	16h	16h	16h
14B <i>Bacillus cereus</i> _KF831402.1(99%_1426bp)(Barroso/BHI)	24h	16h	16h
14GA <i>Pseudomonas</i> sp._HQ840775.1(98%_1433bp)(Laguinho/GA)		24h	24h
16E <i>Enterobacter ludwigii</i> _AJ853891(97,09%_1447bp)(Laguinho/ES)	24h	16h	24h
16LGA <i>Ralstonia mannitolilytica</i> _KF150443.1(96%_1443bp)(Laguinho/GA)	16h	16h	
17GA <i>Enterobacter ludwigii</i> _KC139450.1(99%_882bp)(C.Açutuba/GA)	16h	16h	16h
19A <i>Pseudomonas nitroreducens</i> _JF441245.1(99%_819bp) (C.Açutuba/AIA)	24h	16h	
19E <i>uncultured</i> _Paenibacillus_JN245655.1(98%_1461bp)(Lago Grande/ES)	16h		
19GA <i>Achromobacter</i> sp._JN836430.1(99%_905bp)(C.Açutuba/GA)	16h		
1A <i>uncultured</i> _Micrococcineae(100%_898bp)(Lago Grande/AIA)	16h		
1E <i>Pseudomonas nitrireducens</i> _HM246143(97,27%_1449bp)(C.Açutuba/ES)	16h	16h	16h
1GA <i>Ralstonia mannitolilytica</i> _KF751574.1(99%_871bp)(H.Pastagem/GA)	16h	16h	16h
20A (C.Açutuba/AIA)		16h	16h
20B <i>Bacillus subtilis</i> _JQ900635.1(99%_1469bp)	16h		
21GA <i>Burkholderia</i> sp._JF772524.1(99%_902bp)(C.Açutuba/GA)	16h	24h	24h
22E <i>Arthrobacter niigatensis</i> _AB248526(98,3%_1416bp)(Lago Grande/ES)	16h	16h	
22GA <i>Burkholderia</i> sp._KF922658.1(98%_962bp)(Barroso/GA)	16h	16h	24h
23B <i>Bacillus subtilis</i> _JN366715.1(99%_1444bp)(C.Açutuba/BHI)	24h	16h	16h
23E <i>uncultured</i> _Bacillus_FJ478878.1(99%_1443bp)(Barroso/ES)		24h	24h
27B <i>Bacillus</i> sp._KF206364.1(99%_698bp)(H.Pastagem/BHI)	16h	16h	
27E <i>Arthrobacter</i> sp._JX010952.1(98%_1417bp)(Barroso/ES)	16h		16h
28B <i>uncultured</i> _bacteria_FQ700280.1(82%_679bp)(H.Pastagem/BHI)	16h	16h	24h
28GA <i>Achromobacter</i> sp._JN043371.1(99%_835bp) (H.Capoeira/GA)	24h	16h	24h
29B <i>Bacillus thuringiensis</i> _JF947357.1(99%_1453bp)(H.Pastagem/BHI)	24h		
2A (C.Açutuba/ES)	16h	16h	24h
2E (C.Açutuba/ES)	16h	16h	24h
2GA <i>uncultured</i> _Leclercia_EU850462.1(95%_1446bp)(H.Pastagem/GA)	24h	16h	16h
30A <i>uncultured</i> _Pseudomonas_HM996802.1(98%_914bp)(Barroso/AIA)	16h	2h	
30E <i>Burkholderia caribensis</i> _GU144372.1(98%_1435bp)(Barroso/ES)	16h	16h	16h
30GA <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> _JQ995478.1(99%_870bp)(H.Canavial/GA) alk	24h		24h
31B <i>Bacillus anthracis</i> _AB190217(99,54%_1440bp)(H.Pastagem/BHI)	24h		
31E <i>uncultured</i> _Variovorax_JQ770029.1(97%_808bp)(H.Canavial/ES)	16h	16h	16h
31GA <i>Pseudomonas koreensis</i> _GQ368179.1(98%_1416bp)(H.Canavial/GA)	16h	16h	24h
32T <i>Acinetobacter</i> sp._KC257028.1(99%_893bp)(C.Açutuba/TSA) alk	16h	16h	24h
33GA <i>Pantoea anthophila</i> _JN644500.1(96%_727bp)(H.Canavial/GA)	16h	16h	24h
33T <i>Burkholderia cepacia</i> _AY741362.1(99%_859bp)(C.Açutuba/TSA)	16h	24h	24h
34GA <i>uncultured</i> _Paraplesiomonas(676bp)(H.Canavial/GA)	16h	24h	24h
35GA <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> _ (98.37%_797bp)(H.Canavial/GA)	16h	24h	24h
35T <i>Arthrobacter woluwensis</i> _X93353(97.49%_879bp)(C.Açutuba/TSA) alk	16h	16h	24h
37E <i>Burkholderia</i> sp._AB665358.1(98%_1431bp)(H.Canavial/ES)	24h	16h	24h
38GA <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> _AJ575816(96.22%_794bp)(Laguinho/GA)	24h	16h	16h
3B <i>Bacillus barbaricus</i> _GQ284513.1(98%_1451bp)(H.Canavial/BHI)	16h	16h	
3E <i>Pseudomonas</i> sp._AM088477.1(99%_1438bp)(C.Açutuba/ES) alk		24h	
3GA <i>Achromobacter aegirfaciens</i> _HF586507(97,77%_949bp)(H.Pastagem/GA) alk	24h	8h	
40E <i>Streptomyces tanashiensis</i> _AJ781362(99,23%_1428bp)(H.Canavial/ES)	16h	16h	16h
40GA_1 <i>Burkholderia ubonensis</i> _EU024179(99.65%_894bp)(Laguinho/GA)	16h	24h	24h
41A <i>Achromobacter xylosoxidans</i> _CP006958(97,19%_1421bp)(H.Capoeira/AIA)	16h		
41E <i>Cupriavidus necator</i> _CP002878(99,44%_1435bp)(H.Canavial/ES)	16h		16h
41GA <i>uncultured</i> _Burkholderia_AB916411.1(98%_1429bp)(Laguinho/GA)	16h		

continua

Isolados	conclusão		
	Bifenil	Diesel	Fenantreno
42GA_Leifsonia_sp._JN872512.1(99%_885bp)(Laguinho/GA)	4h	2h	
43A_Arthrobacter_woluwensisAB244289.1(98%_707bp)(Laguinho/GA)	8h	2h	
43GA_Pseudomonas_sp.(100%_786bp)(Laguinho/GA)	16h	24h	
44E_uncultured_Pseudomonas_HM996802.1(97%_897bp) (H.Canavial/ES)	16h	16h	
44GA_Pseudomonas_taiwanensis_EU103629(99,45%_909bp) (Laguinho/GA)	16h	16h	
45GA_Pantoea_anthophila_EF688010(95.00%_841bp)(Lago Grande/GA)	16h	16h	16h
46E_Bacillus_anthraxis_AB190217(99,62%_1445bp)(H.Pastagem/ES) alk	24h		16h
46GA_Pantoea_anthophila_EF688010(98.33%_877bp)(Lago Grande/GA)	16h	16h	
47GA_Arthrobacter_nicotinovorans_X80743(98,65%_900bp)(Lago Grande/GA)	16h		
4B_Bacillus_methylotrophicus_EU194897(99,23%_1441bp)(Barroso/BHI)	16h	16h	16h
51A_putative_Rhodococcus(86%_808bp)(H.Canavial/AIA)	24h		
5E_Enterobacter_ludwigii_KF475862.1(99%_1446bp)(C.Açutuba/ES)	16h	16h	16h
5GA_Enterobacter_sp._JF970207.1(99%_809bp)(H.Pastagem/GA)	24h	16h	24h
62A_Arthrobacter_nicotinovorans_X80743(97,05%_901bp)(H.Pastagem/AIA)	16h	4h	16h
64A_unclassified_Emterobacteriaceae(100%_901bp)(H.Pastagem/AIA)	16h	24h	24h
69A_Arthrobacter_siccitolerans_GU815139(98.05%_720bp)(Laguinho/AIA)	16h		
6B_Lysinibacillus_xylanilyticus_FJ477040(99,11%_1444bp)(Barroso/BHI)	24h	16h	
6GA_Burkholderia_ubonensis_EU024179(99,32%_916bp)(H.Pastagem/GA)	16h	16h	16h
70A_uncultured_Pseudomonas_HM996802.1(99%_1446bp)(Laguinho/AIA)	16h	16h	
74A_putative_Micrococcaceae(95%_684bp)(Laguinho/AIA)	16h		
7A_Bacillus_aerophilus_AJ831844(98.09%_894bp)(Lago Grande/AIA)	24h	16h	24h
7GA_uncultured_Alcaligenaceae_KC179063.1(93%_1408bp)(H.Pastagem/GA)	16h	16h	16h
80A_Arthrobacter_sp._FJ389669.1(99%_1421bp)(Laguinho/AIA)	16h	16h	24h
8A_Acinetobacter_sp._KC257028.1(97%_798bp)(Lago Grande/AIA) alk	16h	16h	16h
8E_Burkholderia_stabilis_AF148554(99,37%_1431bp)(C.Açutuba/ES)	24h	16h	
9A_Paenibacillus_sp._JX434145.1(99%_814bp) (Lago Grande/AIA) alk	16h	16h	
9B_uncultured_Pseudomonadaceae(100%_1441bp)(H.Capoeira/BHI)	16h	16h	16h

Porém, houve variações nas eficiências de degradação que podem ser verificadas nas Figuras 19, 20 e 21, as quais mostram as medições de absorbância do indicador DCPIP nas avaliações de 2h, 4h, 8h, 16h e 24h após o início do bioensaio; e nas velocidades de degradação completa dos substratos apresentadas nas Figuras 22, 23 e 24 nos momentos de avaliação das absorbâncias.

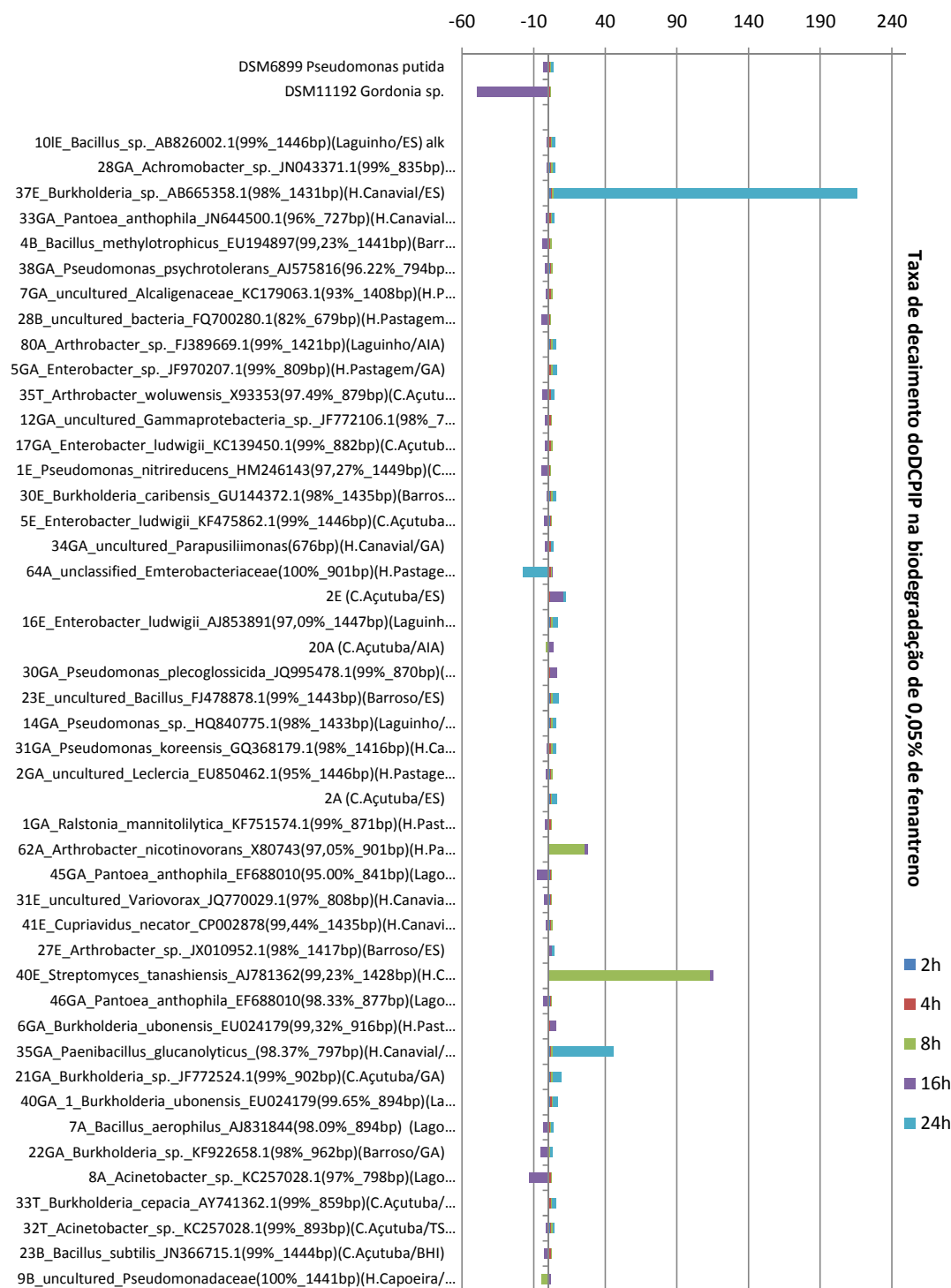


Figura 20 - Detecção do decaimento da fluorescência do indicador DCPIP no bioensaio de degradação de fenantreno a 0,05% como indicador indireto de degradação. Os valores de fluorescência estão plotados segundo cada momento de detecção. Os dados de absorbância a 620nm foram normalizados quanto aos controles negativos. Os controles positivos estão no início do gráfico. Valores próximos a zero e negativos indicam maior taxa de degradação

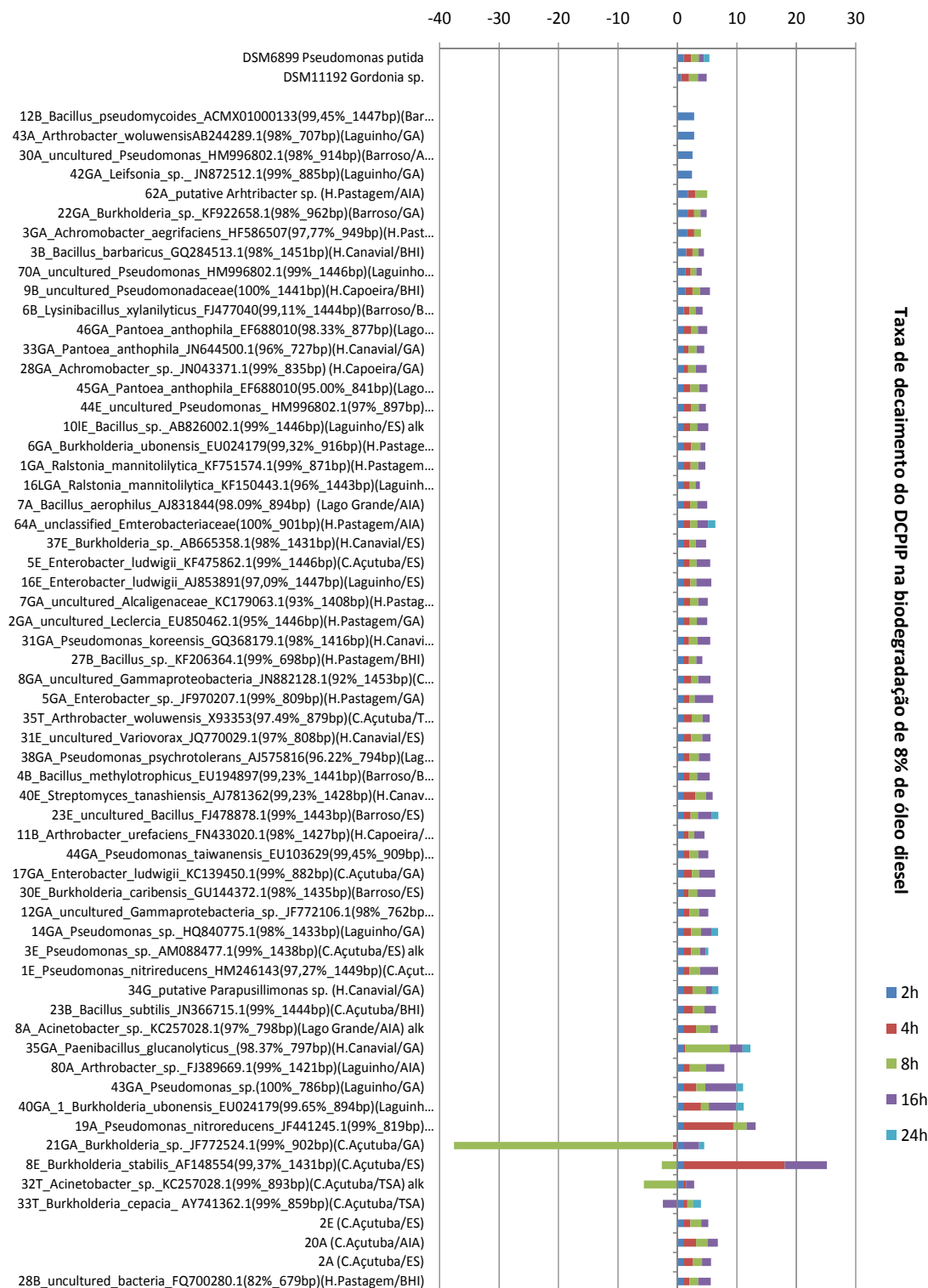


Figura 21 - Detecção do decaimento da fluorescência do indicador DCPIP no bioensaio de degradação de diesel a 8% como indicador indireto de degradação. Os valores de fluorescência estão plotados segundo cada momento de detecção. Os dados de absorbância a 620nm foram normalizados quanto aos controles negativos. Os controles positivos estão no início do gráfico. Valores próximos a zero e negativos indicam maior taxa de degradação

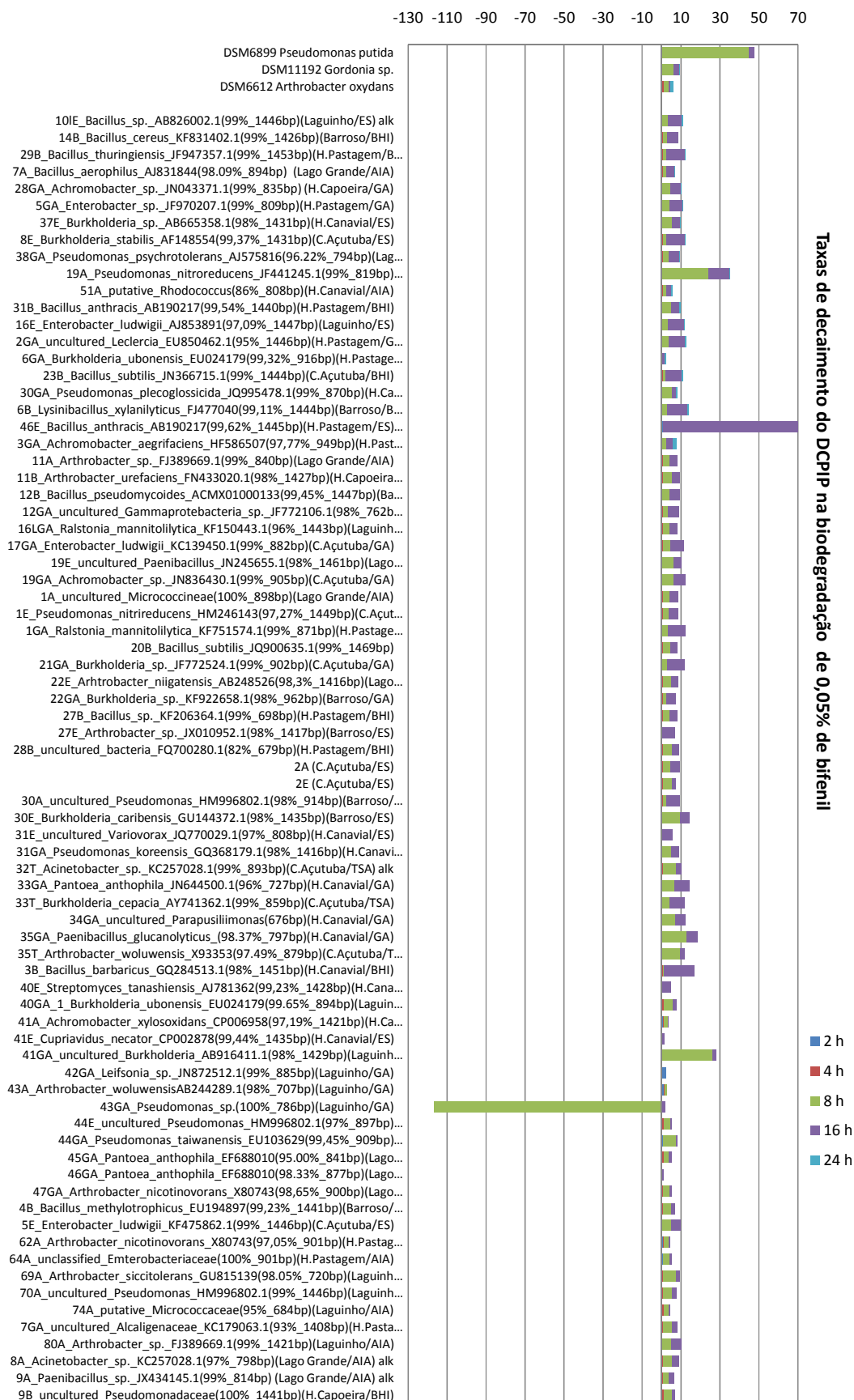


Figura 22 - Detecção do decaimento da fluorescência do indicador DCPIP no bioensaio de degradação de bifenil 0,05% como indicador indireto de degradação. Os valores de fluorescência estão plotados segundo cada momento de detecção. Os dados de absorvância a 620nm foram normalizados quanto aos controles negativos. Os controles positivos estão no início do gráfico. Valores próximos a zero e negativos indicam maior taxa de degradação

Figura 23 - Taxa de degradação de 0,05% de fenantreno pelos isolados bacterianos segundo cada período de detecção em espectrofotômetro. Os dados da absorbância a 620nm foram normalizados segundo os controles negativos como momento 0 h. Após os dados foram convertidos em taxas relativas para cada isolado. Os controles positivos estão no início do gráfico

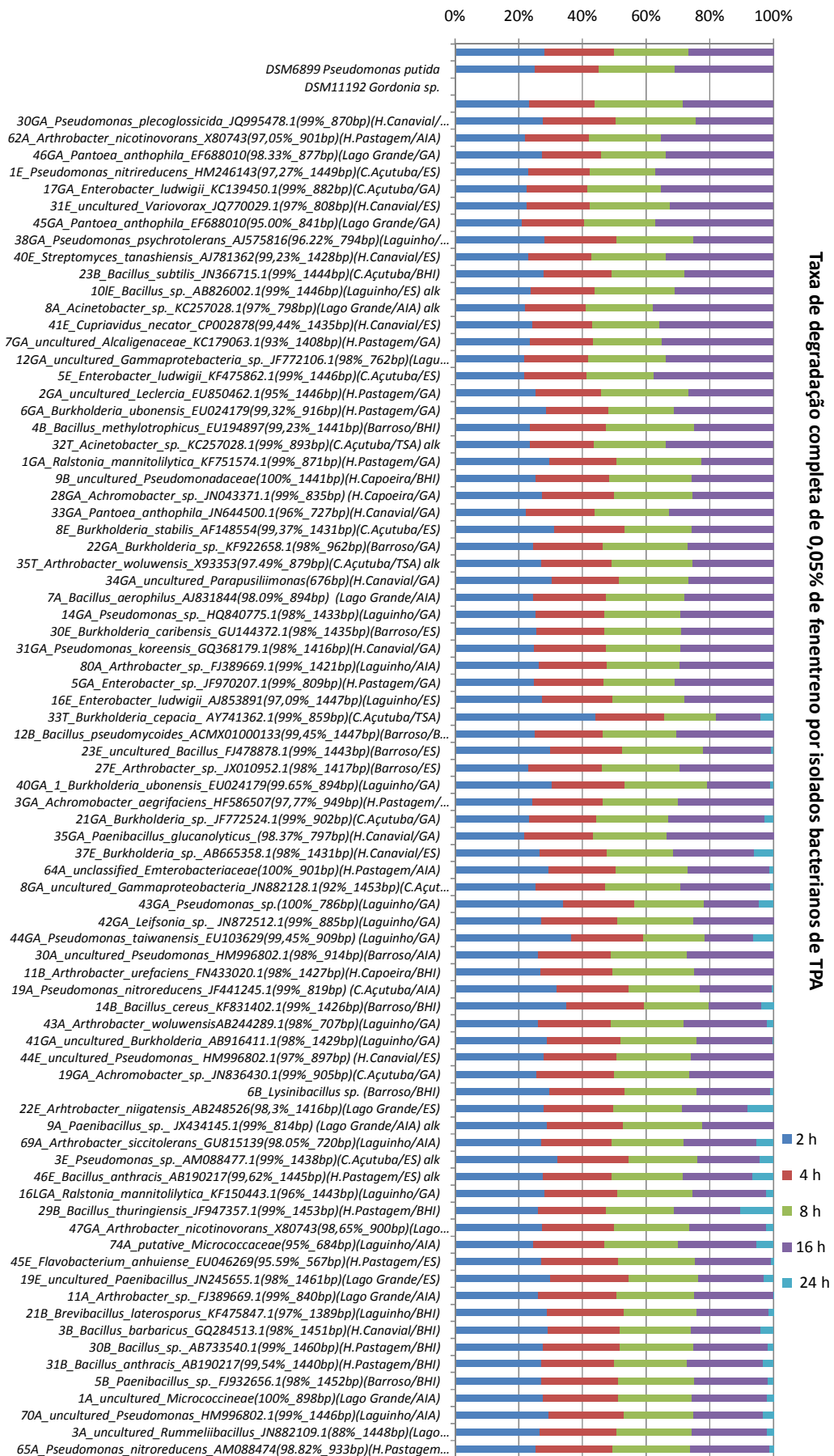


Figura 24 - Taxa de degradação de 8% de óleo diesel pelos isolados bacterianos segundo cada período de detecção em espectrofotômetro. Os dados da absorbância a 620nm foram normalizados segundo os controles negativos como momento 0 h. Após os dados foram convertidos em taxas relativas para cada isolado. Os controles positivos estão no início do gráfico

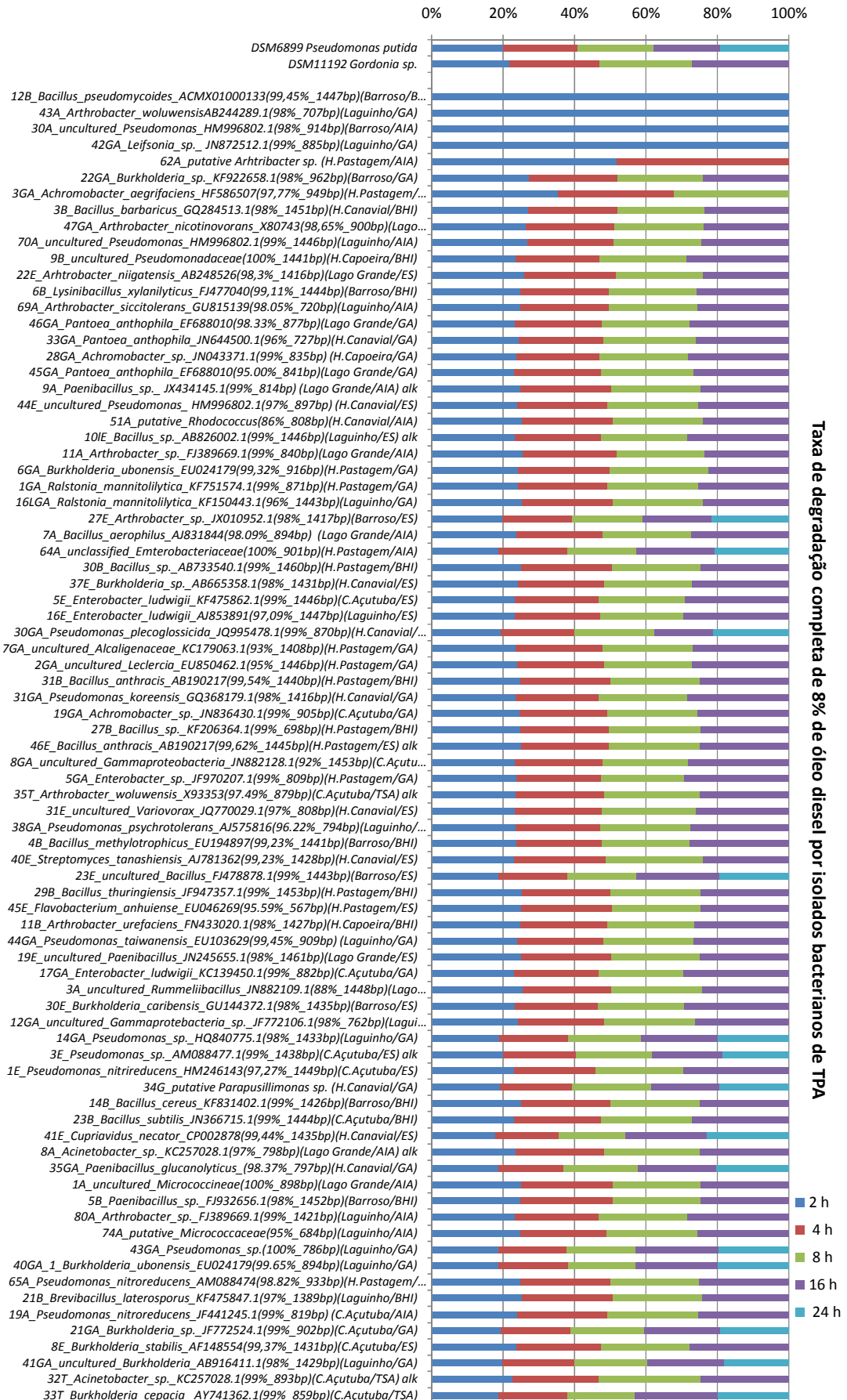
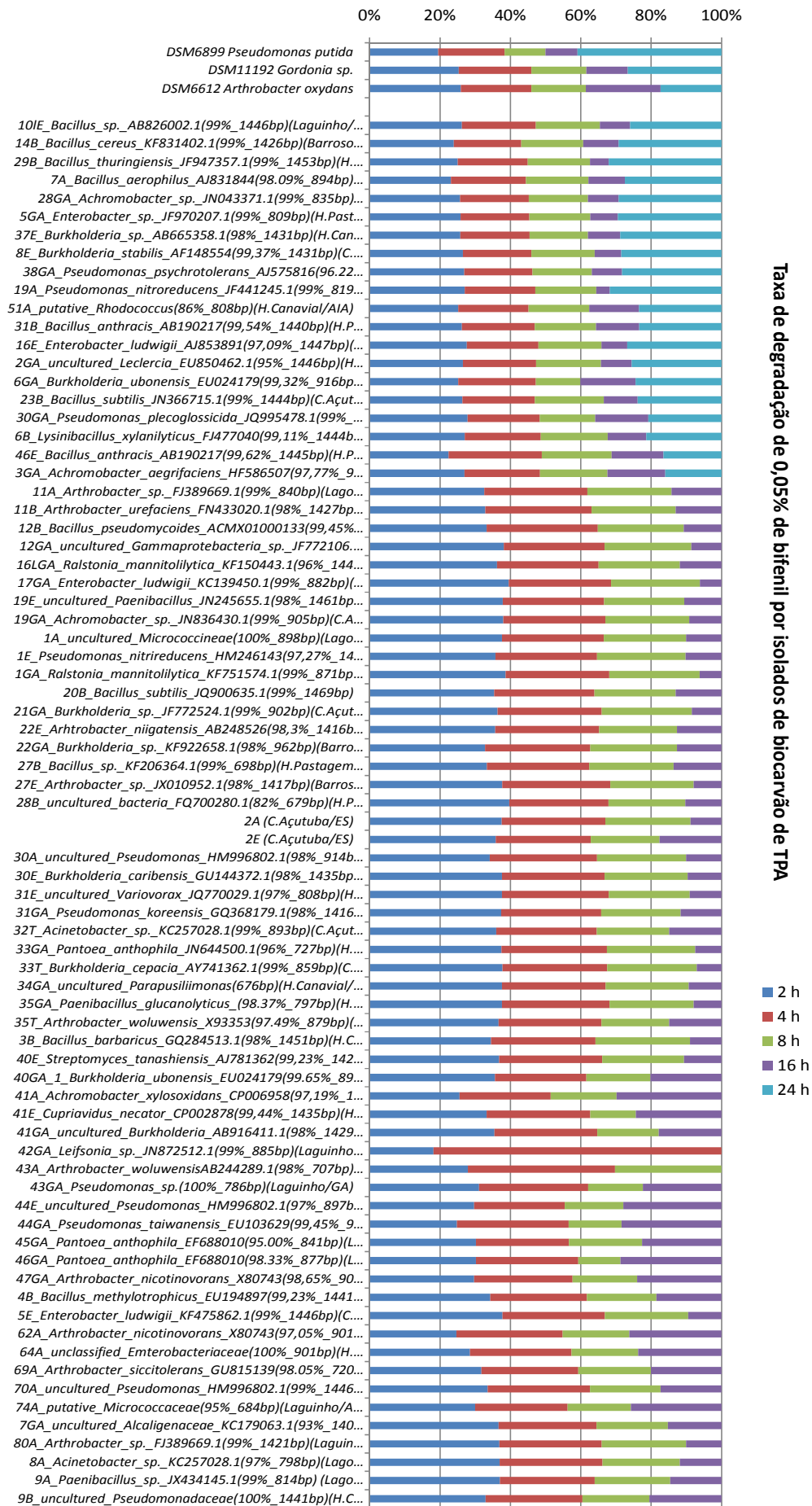


Figura 25 - Taxa de degradação de 8% de óleo diesel pelos isolados bacterianos segundo cada período de detecção em espectrofotômetro. Os dados da absorbância a 620nm foram normalizados segundo os controles negativos como momento 0 h. Após os dados foram convertidos em taxas relativas para cada isolado. Os controles positivos estão no início do gráfico



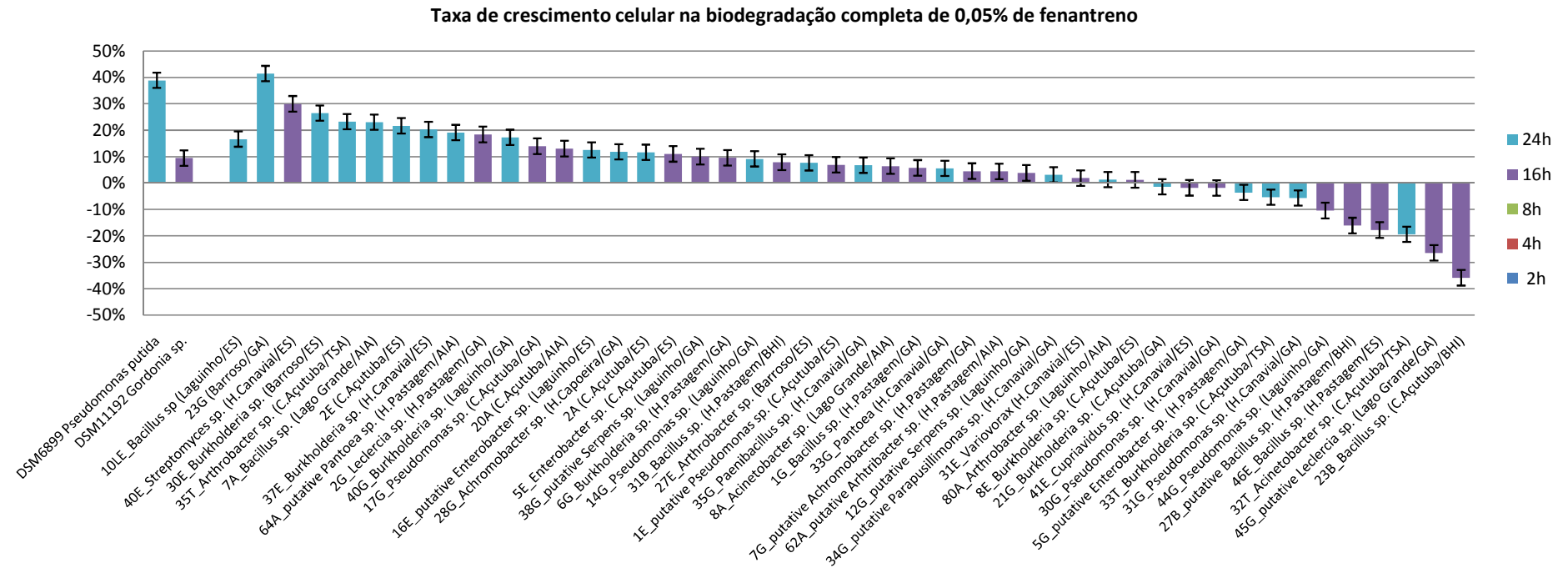


Figura 26 - Taxa de crescimento celular dos melhores isolados bacterianos de biocarvão de TPA após a degradação de 0,05% de fenantreno no meio. Os valores finais de absorbância a 600nm foram subtraídos do valor inicial e taxas relativas foram obtidas e plotadas para os crescimentos

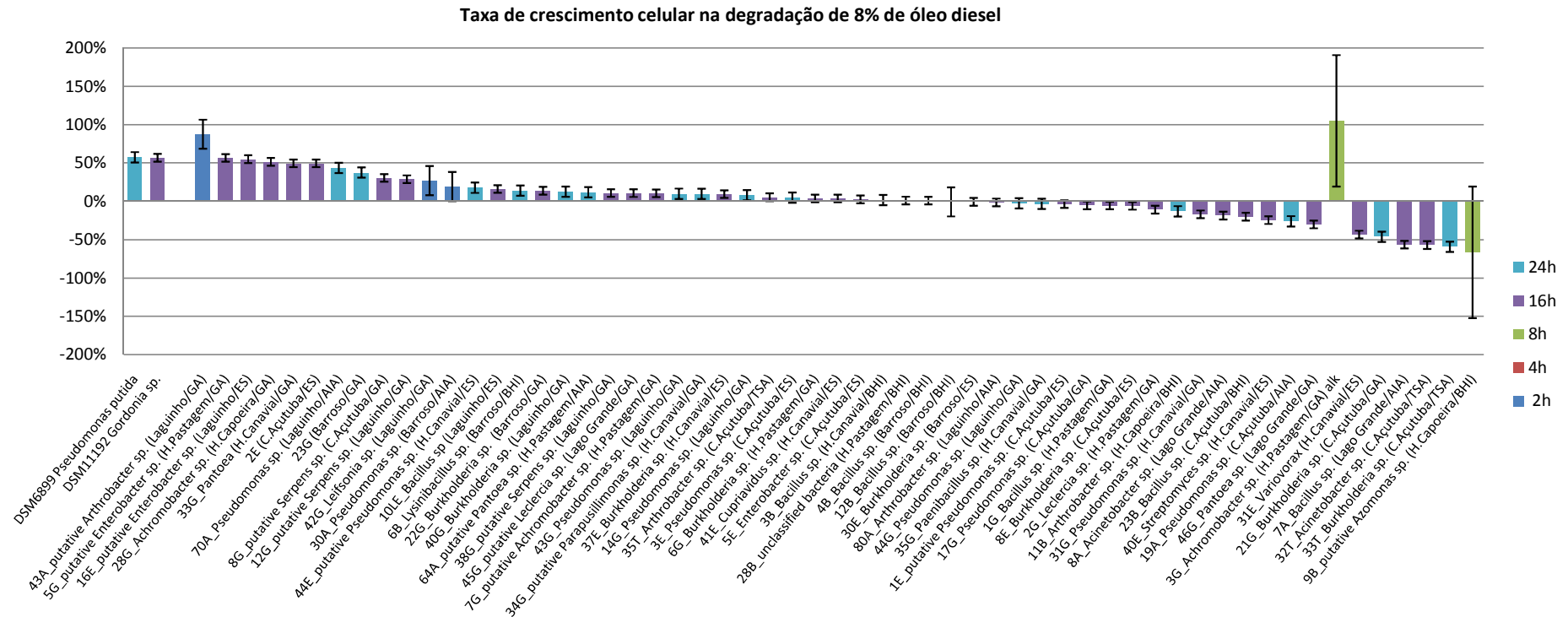


Figura 27 - Taxa de crescimento celular dos melhores isolados bacterianos de biocarvão de TPA após degradação de 8% de óleo diesel no meio. Os valores finais de absorbância a 600nm foram subtraídos do valor inicial e taxas relativas foram obtidas e plotadas para os crescimentos

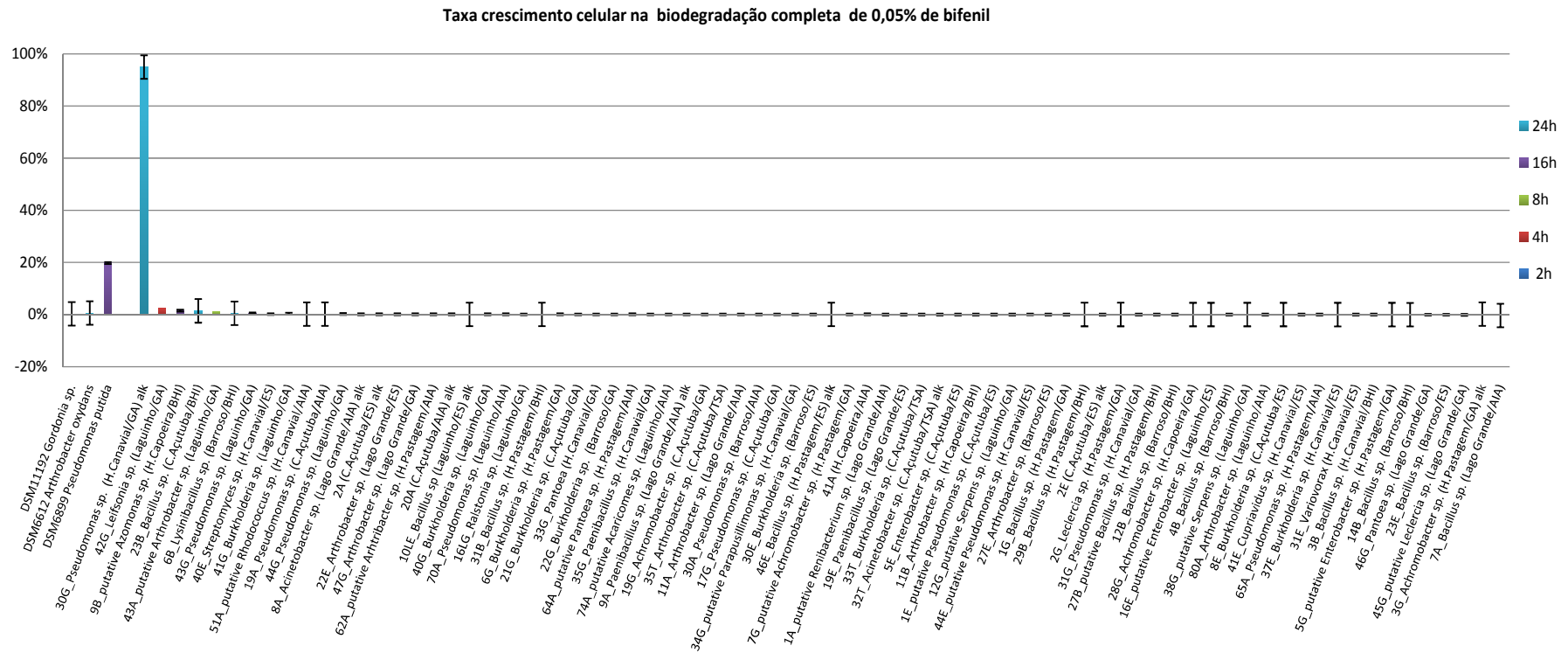


Figura 28 -Taxa de crescimento celular dos melhores isolados bacterianos de biocarvão de TPA após degradação de 0,05% de bifenil no meio. Os valores finais de absorbância a 600nm foram subtraídos do valor inicial e taxas relativas foram obtidas e plotadas para os crescimentos

Observamos que possuidores ou não do gene *alk* foram capazes de degradar eficientemente os 3 substratos, com melhor capacidade de degradação em relação aos microrganismos controles (DSM). Curiosamente houve maior porcentagem de isolados capazes de degradar bifenil, uma molécula composta por duas benzilas. Genomas bacterianos precisam conter sistemas específicos de degradação para clivar o bifenil, como a subfamília de genes do sistema tolueno/bifenil oxigenase que produzem oxigenases possivelmente capazes de degradar bifenil, além de benzeno, clorobenzeno, tolueno, etilbenzeno, isopropilbenzeno (NAM et al., 2001). Os isolados de biocarvão possuem alta capacidade de degradar bifenil e possivelmente outros PCBs e hidrocarbonetos aromáticos complexos, provenientes tanto da estrutura grafítica do carvão, quanto dos grupos funcionais aderidos de bio-óleos vegetais, aos quais os isolados estão familiarizados por terem a capacidade crescer em meios cuja única fonte de carbono foram fenantreno, diesel e bifenil. A capacidade definitiva de degradação de alcanos necessita ser avaliada.

Em segundo lugar está a degradação de óleo diesel, o qual se mostrou mais acessível aos isolados em relação ao fenantreno. Por o diesel ser uma mistura de hidrocarbonetos como alcanos, cicloalcanos, aromáticos e enxofre (ATSDR, 1995), este fornece uma diversa gama de substratos, sendo mais provável sua degradação por diferentes genomas bacterianos. Diferentemente do fenantreno, uma molécula de 3 anéis benzênicos fundidos, que somente os possuidores de sistemas de genes de degradação específicos a este substrato podem degradá-lo, como os genes *pnhA* que produzem as fenantreno dioxigenases. Tais degradações foram verificadas igualmente no estudo de Nakamura, Germano e Tsai (2014) com isolados provenientes de bioensaio de enriquecimento com adição de naftaleno e fenantreno aos solos de TPA. Porém, em comparação a este estudo, verificamos que a fração de isolados positivos à degradação de fenantreno (70,93%) e óleo diesel (53,49%) do biocarvão de TPA é menor em relação à fração de isolados positivos à degradação dos mesmos substratos provenientes do enriquecimento do solo de TPA, em que 86,48% foram positivos ao diesel e 77,70% foram positivos ao fenantreno. Tal fato pode nos indicar que talvez o substrato a que os isolados dos fragmentos de biocarvão estudados estejam familiarizados seja mais próximo ao bifenil e similares, em detrimento de fenantreno e à mistura de hidrocarbonetos encontrada no diesel.

Outro aspecto que chama atenção é que além dos gêneros já conhecidos degradarem hidrocarbonetos aromáticos, como os já citados (item 1.4.2), isolados tidos como não-cultivados obtidos neste trabalho foram muito eficientes na degradação de hidrocarbonetos aromáticos.

Em relação às análises de crescimento bacteriano apresentadas nas Figuras 25, 26 e 27, podemos inferir que os isolados que mais rápido degradaram determinado substrato e, ao mesmo tempo, tiveram pouco crescimento celular foram os absolutos na capacidade degradativa. Tendo por base de que alta degradação por poucas células indica que a eficiência da enzima produzida por uma célula é maior, esta enzima é mais potente e de maior interesse

para processos industriais como produção de biopolímeros, por exemplo. Todavia, uma rápida degradação com alto crescimento celular pode ser mais atrativo na biorremediação de áreas poluídas, por as células se espalharem no ambiente, alcançando maior dimensão e superfície para agirem. Observamos diferentes comportamentos celulares em relação aos diferentes substratos, sendo que quase a totalidade dos isolados teve baixo crescimento celular ao degradar bifenil, possivelmente por possuírem mais genes para produção de oxigenases, ou que suas enzimas possuem alta atividade ao bifenil.

Os processos de biodegradação, juntamente com a biossíntese, regem grande parte do ciclo do carbono, cuja fração biológica é amplamente dependente de enzimas microbianas que utilizam compostos orgânicos presentes no solo como fonte de carbono e energia (WACKETT, 2004). Estes processos funcionais são influenciados por uma série de fatores bióticos e abióticos que determinam a taxa de degradação e a atividade do metabolismo microbiano sobre o composto-alvo. A toxicidade do composto para o microrganismo, suas propriedades físico-químicas (solubilidade, peso molecular, reatividade química, disponibilidade, substituintes, concentração) e as variáveis ambientais (oxigênio dissolvido, pH favorável, temperatura, salinidade) são fatores determinantes do metabolismo destes substratos.

A existência dessa comunidade bacteriana capaz de consumir hidrocarbonetos aromáticos em biocarvão de solos de TPA, como já sugerido por Thies e Rilling (2009), pode ser devido a uma seleção das bactérias com genes capazes de produzir enzimas específicas para degradação desses substratos. A existência de tantos gêneros bacterianos em um mesmo habitat com semelhante capacidade de utilização desses compostos de carbono complexos pode dever-se muito à transferência horizontal de genes por ser um agente importante nas trocas genéticas entre as bactérias (WHYTE et al., 1997) e um fator para a evolução de populações bacterianas à adaptação dessas comunidades a ambientes contaminados (WERLEN et al., 1996; HERRICK et al., 1997) ou com altos teores naturais de compostos de carbono complexos como hidrocarbonetos aromáticos e alcanos.

6. CONCLUSÕES

As técnicas escolhidas foram satisfatórias na obtenção de importantes gêneros de *Bacteria* nos fragmentos de biocarvão. O método de microaerofilia possibilitou o isolamento de bactérias tanto aeróbias quanto anaeróbias facultativas. Os meios GA e extrato de solo TPA comprovaram ser um método com boa eficiência para isolamento de quantidade e variedade de bactérias do carvão.

Os filos encontrados foram *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* e ainda foram encontradas bactérias não-cultivadas.

Os bioensaios de degradação com hidrocarbonetos aromáticos indicaram que mais da metade dos isolados foi capaz de degradá-los e a maioria conseguiu degradar mais de um substrato. Assim, podemos concluir que existem bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos complexos e variados nos fragmentos de biocarvão de TPA.

Observamos que 12,70% dos isolados possuem genes *alkB* ou *alkM*, o que indica que existem bactérias possivelmente degradadoras de lignocelulose no biocarvão de TPA.

Este estudo demonstra que os biocarvões de TPA são um microhabitat para microrganismos com capacidade comprovada em metabolizar hidrocarbonetos aromáticos complexos e diversos como fonte de carbono e energia, sendo capazes de degradar fragmentos de biocarvão, ácidos húmicos e, possivelmente, grupos funcionais aderidos, além de outras frações da matéria orgânica humificada compreendendo processos enzimáticos fundamentais no solo para manutenção do desenvolvimento de plantas.

Assim, os dados gerados por este estudo fornecem informações sobre o papel dessas bactérias na ciclagem de nutrientes, que influenciam diretamente na resiliência e fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia, como, por exemplo, o aporte e contenção de nutrientes no solo, alta humificação da matéria orgânica e altas trocas catiônicas.

Neste contexto, o biocarvão de TPA pode servir como elemento de recuperação para melhora das características biológicas de ambientes degradados, agindo como condicionador do solo, sendo uma forma alternativa de manejo de solos agrícolas.

Além disso, os isolados apresentam um grande potencial biotecnológico para a geração de moléculas ligadas aos processos metabólicos da biodegradação, principalmente os não-cultivados, podendo auxiliar processos de biorremediação de áreas contaminadas e, possivelmente, geração de biocombustíveis de segunda geração.

7. PERSPECTIVAS

O estudo de microrganismos com potencial biotecnológico necessita de diversas experimentações para uma profunda caracterização de sua biologia, capacidade, utilização e segurança. Deste modo, o estudo carece de mais ensaios para uma possível utilização dos isolados em processos de interesse.

Bioensaios de degradação com alcanos, como celulose, hemicelulose e lignina, seriam cruciais para a caracterização dos isolados do estudo e, principalmente, dos possuidores de gene *alkB* e *alkM*. Assim como bibliotecas de expressão seriam importantes para entender a anotação dos genes isolados.

Outro estudo recai sobre os fatores que afetam a transferência horizontal de genes na relação entre doador e receptor da conjugação, densidade das células, relação entre as populações e período de incubação (FERNANDEZ-ASTORGA, 1992) e tais fatores devem ser estudados a fundo para melhor entender a relação das bactérias no microhabitat de biocarvão de TPA.

Em relação aos bioensaios de degradação, a marcação dos compostos por átomos marcados, como na técnica SIP (Stable Isotope Probing) (DUMONT; MURELL, 2005), seria a melhor forma de monitorar o caminho metabólico do carbono proveniente dos compostos complexos para entender sua utilização pelas bactérias, ou seja, avaliar em quais substâncias estão sendo transformados e entender a natureza e atividade de suas enzimas.

Ainda análises de transcritos por manipulação do RNAm seriam de grande valia para entender como estas bactérias estão agindo no microhabitat de biocarvão.

Por fim, a caracterização molecular pelo método PI-GC/MS poderia identificar diferentes grupos funcionais no carvão, sendo de grande valia para nosso entendimento em que substrato a microbiota do biocarvão e o solo de TPA está interagindo.

REFERÊNCIAS

ACD/STRUCTURE ELUCIDATOR. Version 12.01. Toronto, ON: Advanced Chemistry Development, Inc., 2014. Disponível em: www.acdlabs.com.

ADLER, E. Lignin chemistry—past, present and future. **Wood Science and Technology**, New York, v. 11, p. 169-218, 1977.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Toxicological profile for fuel oils**. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1995.

AHMAD, M.; ROBERTS, J. N.; HARDIMAN, E. M.; RAHUL SINGH, R.; ELTIS, L. D.; BUGG, T. H. D. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 50, n.23, p. 5096–5107, 2011. doi: 10.1021/bi101892z.

AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, p. 925–931, 2006.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDERSSON, J. O.; ANDERSSON, S. G. E. Pseudogenes, junk DNA, and the dynamics of *Rickettsia* genomes. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v.18, p.829–839, 2001.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 35, p. 317-327, 1995.

BARKAY, T.; PRITCHARD, H. Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. **Microbiological Sciences**, Oxford, v.5, p.165-169, 1988. PMID:3079233.

BENITES, V. M., MADARI, B. E., MACHADO, P. L. O. A. **Matéria Orgânica do Solo**. In Wadt, P.G.S. (Ed). Manejo do Solo e Recomendação de Adubação para o Estado do Acre. Rio Branco: Embrapa Acre, 2005. p. 93-120.

BODIG, J.; JAYNE, B. A. **Mechanics of wood and wood composites**. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 1982.

BOEHM, H. P. Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons. **Carbon**, New York, v. 32, p. 759–769, 1994.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p.2647-2653, 1997.

BOSSERT, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: ATLAS, R.M. **Petroleum microbiology**. New York: Macmillan Publishing, 1984. p. 434-476.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **An introduction to the nature and properties of soils**. 14.ed.Upper Saddle River:Prentice Hall, 2008. 881p.

BRITO, J. O.; BARRICHELO, L. E.G. Correlações entre características físicas e químicas da madeira e a produção de carvão vegetal: I. Densidade e teor de lignina da deira de eucalipto. **IPEF**, Piracicaba, n.14, p.9-20, 1977.

BRITTON, L. N. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: GIBSON, D.T. **Microbial degradation of organic compounds**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 89-129.

BROSSI, M. J. D. L.; MENDES, L. W.; GERMANO, M. G.; LIMA, A. B., TSAI, S. M. Assessment of bacterial *bph* gene in Amazonian Dark earth and their adjacent. soils. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e99597, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0099597.

BUGG, T. D. H. **Lignin degradation**. Gibbet Hill, Coventry, 2012. Disponível em: <http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/bugg/bugggroup/research/lignin/>. Acessado em: 23 jun. 2014.

BUGG, T. D.; AHMAD, M.; HARDIMAN, E. M.; RAHMANPOUR, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, London, v. 28, p. 1883-1896, 2011.

BUGG, T.D.H.; AHMAD, M.; HARDIMAN, E. M.; SINGH, R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, p. 394–400, 2011.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; RESENDE, C. E.; SANTOS, G. A. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhço e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 935-944, 2003.

CANNAVAN, F. S. **A estrutura de comunidades microbianas (*Bacteria* e *Archaea*) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

CAO, G.; ZHAO, L.; WANG, A.; WANG, Z.; REN, N. Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria. **Biotechnology for Biofuels**, London, v.7,p.82-95, 2014.

CENTRO DE ARQUEOLOGIA DOS BIOMAS DA AMAZÔNIA - CABA. Disponível em: <http://www.caba.usp.br/arqueologia.php>. Acessado em: 05 jun. 2013.

CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 3, p. 351–368, 1992.

CHANDRA, R.; RAJ, A.; PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, p. 839–846, 2007.

CHEN, W.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BENA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.185, n.4, p.7266-7272, 2003.

CHRISTOVA, N.; TULEVA, B.; LALCHEV, Z.; JORDANOVA, A.; JORDANOV, B. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on n-hexadecane. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, Tübingen, v.59, n.1-2, p.70-74, 2004.

COLLET, F. Estudo comparativo, em escala de laboratório, de diversas madeiras utilizadas na fabricação de carvão vegetal. **Boletim da Associação Brasileira de Metais**, São Paulo, v. 42, n.12, p. 5-14, 1955.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, n.3, p.491-503, 1999.

CUNHA, T. J. F.. **Ácidos húmicos de solos escuros da Amazônia (Terra Preta do Índio)**. 2005. 139 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

CUNHA, T. J. F.; MADARI, B. E.; BENITES, V. M.; CANELLAS, L. P.; NOVOTNY, E. H.; MOUTTA, R. O.; TROMPOWSKY, P. M.; SANTOS, G. A. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte a antrópico da amazônia (Terra Preta). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 1, p. 91 - 98, 2007.

DAANE, L. L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G. J.; HAGGBLOM, M. M. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.67, p.2683-2691, 2001. doi:10.1128/AEM.67.6.2683-2691.2001

DAS, A.; PAUL, T.; HALDER, S. K.; CHIRANJIT MAITY, C.; MOHAPATRA, P.K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Study on regulation of growth and biosynthesis of cellulolytic enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* ABK9. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 62, n. 1, p. 31–43, 2013.

DOWNIE, A. E.; VAN ZWIETEN, L.; SMERNIK, R. J.; MORRIS, S.; MUNROE, P. R. Terra Preta Australis: Reassessing the carbon storage capacity of temperate soils. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 140, p. 137-147, 2011.

DU, H.G.; MORI, E.; TERAOKA, H.; TSUZUKI, E. Effect of the mixture of charcoal with pyroligneous acid on shoot and root growth of sweet potato [*Ipomoea batatas*]. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 67, n. 2, p. 149-152, 1998.

DU, H.G.; OGAWA, M.; ANDO, S.; TSUZUKI, E.; MURAYAMA, S. Effect of mixture of charcoal with pyroligneous acid on sucrose content in netted melon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud.) fruit. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 369-373, 1997.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, p. 143-152, 2002.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p.1792-1797, 2004b.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, London, v.5, p.113-131, 2004a.

EL-NAKEEB, M. A.; LECHEVALIER, H. A. Selective isolation of aerobic actinomycetes. **Applied Microbiology**, Washington, DC, v.11, n.2, p.75-77, 1963.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** – região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 261 p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, DF, 2013. 353p.

EWING, B.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HIJIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.175-185, 1998.

FAO. **Soil map of the world**. Revised legend. Reprinted with corrections. Rome, 2001. (World Resources Report, 60).

FAO. **World reference base for soil resources**. Rome, 1998. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w8594e/w8594e00.htm>.

FARIA, A.F.; TEODORO-MARTINEZ, D.S.; BARBOSA, G.N.O.; VAZ, B.G.; SILVA, I.S.; GARCIA, J.S.; TÓTOLA, M.R.; EBERLIN, M.N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O.L.; DURRANT, L.R. Production and structural characterization of surfactin (C 14 /Leu 7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, p.1951–1957, 2011.

FARIAS, N. A. F.; OLIVEIRA, L. A. Uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos em pupunheira num latossolo da região amazônica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3., 1994, Londrina. **Anais...** Londrina: SBMS, 1994.

FENG, Y.; JIAN, X. J.; ZHU, L. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. **Forest Studies in China**, Beijing, v.11, p. 202–207, 2009.

FERNANDES, A. N.; THOMAS, L. H.; ALTANER, C. M.; CALLOW, P.; FORSYTH, V. T.; APPERLEY, D. C.; KENNEDY, C. J.; JARVIS, M. C. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington DC, v.108, n. 47, 2011. doi:10.1073/pnas.1108942108.

FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: ATLAS, R.M. **Petroleum microbiology**. New York: Macmillan, 1984.p. 355-398.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic outline of the Prokaryotes**. Bergey's manual of systematic bacteriology. Release 5.0. 2. ed. New York: Springer, 2004.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 34, p. 36-43, 2005.

GEHLE, K. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. Case Studies in Environmental Medicine. Atlanta: ATSDR, 2009. 68p.

GERMANO, M. G. **Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

GERMANO, M. G.; CANNAVAN, F. S.; MENDES, L. W.; LIMA, A. B.; TEIXEIRA, W. G.; PELLIZARI, V. H.; TSAI, S. M. Functional diversity of bacterial genes associated with aromatic hydrocarbon degradation in anthropogenic dark earth of Amazonia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, p. 654–664, 2012.

GIBSON, D.T.; PARALES, R.E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v.11, p.236-243, 2000.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society, Interface**, London, v. 9, p. 2749–2766, 2012. doi:10.1098/rsif.2012.0341.

GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 362, p. 187–196, 2007.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Persistence of soil organic matter in archaeological soils (Terra Preta) of the Brazilian Amazon region. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, 2000. p. 190-194.

GLASER, B.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W.; RUIVO, M.L. Soil organic matter stability in Amazonian Dark Earths. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 141–158.

GLASER, B.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. The “Terra Preta” phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humic tropics. **Die Naturwissenschaften**, Berlin, v. 88, p. 37-41, 2001.

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soil in the tropics with charcoal – a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 219-230, 2002.

GOLCHIN, A.; CLARKE, P.; BALDOCK, J.A.; HOGASHI, T.; SKEJEMTAD, J.O.; OADES, J.M. The effects of vegetation and burning on the chemical composition of soil organic matter in a volcanic ash soil as shown by ^{13}C NMR spectroscopy: I whole soil and humic acid fraction. **Geoderma**, Amsterdam, v.76, p.155-174, 1997.

GOLYSHINA, P. N.; DOS SANTOS, V. A.P.M.; KAISER, O.; FERRER, M.; YULIA S.; SABIROVA, Y.S.; LÜNSDORF, H.; CHERNIKOVA, T.N.; GOLYSHINA, O.V.; YAKIMOV, M.M.; PÜHLER, A.; TIMMIS, K.N. Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 106, n. 2-3, p. 215-220, 2003.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographic tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.195-202, 1998.

GOYAL, V.; MITTAL, A.; BHUWAL, A. K.; SINGH, G.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase production using pretreated rice straw by *Bacillus* sp. 313SI under stationary and shaking conditions. **Biotechnology Research International**, New York, n. 651839, 2014. doi: 10.1155/2014/651839.

GUPTA, P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of cellulose degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, New York, art. 578925, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/578925>.

HABE, H.; OMORI, T. Genetic of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v. 67, p. 225-243, 2003. doi:10.1271/bbb.67.225.

HALL, B. G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v.30, n.5, p.1229-1235, 2013.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.41, p.95-98, 1999.

HAMAKI, T.; SUZUKI, M.; FUDOU, R.; JOJIMA, Y.; KAIJURA, T.; TABUCHI, A.; SEN, K.; SHIBAI, H. Isolation of Novel Bacteria and Actinomycetes Using Soil-Extract Agar Medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.99, n.5, p.485-492, 2005.

HANDELSMAN, J.; SMALLA, K. Conversations with the silent majority. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 6, p. 271-273, 2003.

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v.7, p.745-748, 1993.

HARTT, F. Contribuição para a etnologia do Vale do Amazonas. **Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 6, p.10-14, 1885.

HARVEY, R.G. **Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity**. Cambridge:Cambridge University Press, 1991. (Monographs in Cancer Research).

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal rRNA analysis of uncultivated organisms. **Microbial Ecology**, New York, v.35, p.1-21,1998.

HECHT, S. Indigenous Soil Management and the Creation of Amazonian Dark Earth: implications of kayapó practices. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.354-372.

HERBERT, R.A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: NORRIS, J.R.; GRIGOROVA, R. (Ed.). **Methods in microbiology: techniques in microbial biology**. San Diego: Academic Press, 1990, p. 1-40.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v.44, n.2, p. 121-129, 2001.

HUPERT-KOCUREK, K.; SACZYŃSKA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Cadmium increases catechol 2,3-dioxygenase activity in *Variovorax* sp. 12S, a metal-tolerant and phenol-degrading strain. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.104, n.5, p.845-53, 2013. doi: 10.1007/s10482-013-9997-y.

Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional - IPHAN. **Coletânea da legislação de proteção ao patrimônio cultural**. Manaus, AM. 1988. p.199-225.

IWAI, S.; CHAI, B.; SUL, W.J.; COLE, J.R.; HASHSHAM, S.A.; TIEDJE, J.M. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. **The ISME Journal**, London, v.4, p.279–285, 2010.

JANSHEKAR, H.; FIECHTER, A. Pentoses and lignin. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, Berlin, v.27, p.119-178, 1983.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 8, p. 275-282, 1992.

JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 45, p. 57-88, 2000.

KÄMPF, N.; WOODS, W.; SOMBROEK, W.; KERN, D.; CUNHA, T. J. F. Classification of Amazonian Dark Earths and other ancient anthropic soil. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.78-98.

KARRO, J. E.; YAN, Y.; ZHENG, D.; ZHANG, Z.; CARRIERO, N.; CAYTING, P.; HARRISON, P.; GERSTEIN, M. Pseudogene.org: a comprehensive database and

comparison platform for pseudogene annotation. **Nucleic Acids Research**, London, v.37, p. D55–60, 2007.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.74, p.65-76, 1999.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 211-236, 2002. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161120.

KERN, D.C.; COSTA, M.L. **Os solos antrópicos**. In: LISBOA, P.L.B. (Org.). Caxiuanã. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1997. p. 105-119.

KERN, D.; KÄMPF, N. Antigos assentamentos indígenas na formação dos solos com terra preta arqueológica na região de Oriximina, Pará. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.13, p. 219-225, 1989.

KERN, H. W.; KIRK, T. K. Influence of Molecular Size and Ligninase Pretreatment on Degradation of Lignins by *Xanthomonas* sp. Strain 99. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 53, p. 2242-2246, 1987.

KHORASANI, A. C.; MASHREGHI, M.; YAGHMAEI, S. Study on biodegradation of Mazut by newly isolated strain *Enterobacter cloacae* BBRC10061: improving and kinetic investigation. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, Heidelberg, v.10, n.1, p.2-7, 2013. doi: 10.1186/1735-2746-10-2.

KIM, J.; SPAROVEK, G.; LONGO, R.M.; MELO, W. J.; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 684–690, 2007

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, N.H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YE, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.62, p.716–721, 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v.16, p.111-120, 1980.

KIRK, J. E.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. Enzymatic "Combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KLEINMAN, P.J.A.; PIMENTEL, D.; BRYANT, R.B. The ecological sustainability of slash-and-burn agriculture. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 52, p. 235-249, 1995.

KRAMER, R. W.; KUJAWINSKI, E. B.; HATCHER, P. G. Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Environmental Science and Technology**, Washington DC, v. 38, pp. 3387–3395, 2004.

KRAMER, R.W.; KUJAWINSKI, E.B.; HATCHER, P.G. Identification of Black Carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Environmental Science and Technology**, Easton, v.38, p. 3387-3395, 2004.

KRICKA, W.; FITZPATRICK, J.; BOND, U. Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass: a perspective. Review Article. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 174, p. 1-11, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00174.

KUHN, E.; BELLICANTA, G.S.; PELLIZARI, V.H. New alk genes detected in Antarctic marine sediments. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.11, n.3, p.669–673, 2009.

KUMAR, S.; STECHER, G.; PETERSON, D.; TAMURA, K. MEGA-CC: Computing Core of Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program for Automated and Iterative Data Analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v.28, p.2685-2686, 2012.

KUO, C. H.; MORAN, N. A.; OCHMAN, H. The consequences of genetic drift for bacterial genome complexity. **Genome Research**, Woodbury, v.19, p. 1450–1454, 2009.

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. **Microbial genetic resources and biodiscovery**. Oxford, UK: WFFC Publishing, 2004. 400 p.

KUTZNER, H. J. The family Streptomycetaceae. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Ed.). **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. New York, NY: Springer-Verlag, 1986. v. 2, p. 2028–2090.

KWEON, O.; KIM, S.-J.; BAEK, S.; CHAE, J.-C.; ADJEI, M.D.; BAEK, D.-H.; KIM, Y.-C.; CERNIGLIA, C.E. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. **BMC Biochemistry**, London, v.9, p. 11, 2008. doi: 10.1186/1471-2091-9-11.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 43-84, 2005.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotic and other bioactive microbial metabolites**. New York: Plenum Press, 1993. 235 p.

LEAVITT, J. M.; NAIDORF, I. J.; SHUGAEVSKY, P. The undetected anaerobe in endodontics: a sensitive medium for detection of both aerobes and anaerobes. **The New York Journal of Dentistry**, New York, v. 25, p. 377-382, 1955.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEHMANN, J.; JOSEPH, S. **Biochar for environmental management**: science and technology. London: Earthscan, 2009. 444 p.

LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GERMAN, L.; MCCANN, J.; MARTINS, G.C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths**: Origin, properties, management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 105-124.

LEHMANN, J.; SILVA, J. P.; STEINER, C.; NEHLS, T.; ZECH, W.; GLASER, B. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: Fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant and Soil**, The Hague, v. 249, p. 343-357, 2003.

LEISOLA, M.; KOZULIC, B.; MEUSSDOERFFER, F.; FIECHTER, A. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, p. 419-424, 1987.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. Host tests methods. In: _____. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. 2. ed. Oxford: British Society for Plant Pathology; Blackwell Scientific Publications, 1987. chap. 5, p. 167-168.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Estimativas de biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. (Ed.). **Biodiversidade brasileira**: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 2002. p. 91.

LIANG, B.; LEHMANN, J.; SOLOMON, D.; KINYANGI, J.; GROSSMAN, J.; O'NEILL, B.; SKJEMSTAD, J. O.; THIES, J.; LUIZAO, F. J.; PETERSEN, J.; NEVES, E. G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1719-1730, 2006.

LIMA, H. N. **Gênese, química e micromorfologia de solos da Amazônia Ocidental**. 2001. 176 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

LIMA, T.M.S.; PROCÓPIO, L.C.; BRANDÃO, F.D.; CARVALHO, A.M.X.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, p. 585-592, 2011.

LINDEN, D.; SUN, Z. **Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways**. Biphenyl Pathway Map. St. Paul: EAWAG, 2014. Disponível em: http://umbbd.ethz.ch/bph/bph_map.html. Acessado em: 22 jun. 2014.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes

encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LUTON, P. E.; WAYNE, J. M.; SHARP, R. J.; RILEY, P. W. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 3521–3530, 2002.

LYNCH, J. M.; HOBBI, J. E. **Micro-organisms in action: concepts and applications in microbial ecology**. Oxford:Blackwell Science, 1988. 363p.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v.66, p.506–577, 2002. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.

MAIA, C.M.B.F.; MADARI, B.O.; NOVOTNY, E.H. Advances in Biochar Research in Brazil. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, Tokyo, v. 5, n. 1, p. 53-58, 2011.

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MASIELLO, C. A. New directions in black carbon organic geochemistry, **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 92, p. 201–213, 2004.

MCCANN, J.M.; WOODS, W.I.; MEYER, D.W. Organic matter and anthrosols in Amazonia: interpreting the Amerindian legacy. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Ed.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford, UK: CAB International, 2001. p. 180-189.

MEGGERS, B. Environmental Limitation on the Development of Culture. **American Anthropologist**, Washington DC, v. 56, p.801-823, 1954.

MEGGERS, B. **Judging the Future by the Past: The Impact of Environmental Instability on Prehistoric Amazonian Populations**. In: Indigenous Peoples & the Future of Amazonia. The University of Arizona Press, 1995.

MEIRA, A.M. **Diagnóstico sócio-ambiental e tecnológico da produção de carvão vegetal no município de Pedra Bela, Estado de São Paulo**. 2002. 105 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MISHRA, V.; LAL, R.; SRINIVASAN. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, p.133-166, 2001. doi: 10.1080/20014091096729.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625p.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGETB, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Micrological Reviews**, Washington, DC, v. 165, n. 5, p.363–375, 2010.

MUTNURI, S.; VASUDEVAN, N.; KAESTNER, M. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.67, p.569-576, 2005. doi: 10.1007/s00253-005-1905-6.

NAKAMURA, F. M.; GERMANO, M. G.; TSAI, S. M. Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon Dark Earth. **Diversity**, Basel, v. 6, n. 2, p.339-353, 2014.

NAM, J. W.; NOJIRI, H.; YOSHIDA, T.; HABE, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 254-263, 2001.

NAVARRETE, A. A.; CANNAVAN, F. S.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, Basel, v.2, p.787-809, 2012.

NEVES, E. G.; COSTA, F. W. S.; LIMA, F. L. E.; LIMA, H. P.; MACHADO, J. S.; REBELLATO, L.; SILVA, C. A.; DONATTI, P. B. **Levantamento Arqueológico da área de confluência dos Rios Negro e Solimões, estado do Amazonas**: Continuidade das escavações, análise da composição química e montagem de um sistema de informações geográficas. São Paulo: FAPESP, 2003.

NEVES, E. G.; PETERSON, J. B.; BARTONE, R. N.; DA SILVA, C. A. Historical and Socio-cultural OriginsofAmazonianDarkEarths.In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths**: Origin, properties, management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 29-50.

NEVES, E. J.; PETERSON, B.; BARTORE, R. N.; HECKENBERGER, M. J.The timing of Terra Preta formation in the Central Amazon: Archaeological Data from three sites. In: GLASER, B.; WOODS, W. I. **Amazon Dark Earth**: Exploration in Space and Time. Heidelberg: Springer Verlag, 2004.p. 125-134.

NOVOTNY, E. H.; HAYES, M. H. B.; MADARI, B. E.; BONAGAMBA, T. J.; AZEVEDO, E. R.; SOUZA, A. A.; SONG, G.; NOGUEIRA, C. M.; MANGRICH, A. S. Lessons from the Terra Preta de Índios of the Amazon region for the utilisation of charcoal for soil amendment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1003-1010, 2009.

NUNES, G. L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2006. 84 p. Dissertação (MestradoemMicrobiologiaAgrícola)–EscolaSuperiordeAgricultura“LuizdeQueiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

O’NEILL, B. E.; GROSSMAN, J. M.; TSAI, S. M.; LIANG, B.; NEVES, E.; LEHMANN, J.; THIES, J. E. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ

distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, n. 1, p. 192–205, 2009.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, DC, v.276, p. 734-740, 1997.

PARK, J.; CROWLEY, D. E. Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.72, p.1322-1329, 2006.

PATHAK, A.; GREEN, S. J.; OGRAM, A.; CHAUHAN, A. Draft genome sequence of *Rhodococcus opacus* strain M213 shows a diverse catabolic potential. **Genome Announcements**, Washington, DC, v. 1, n. 1, p. e00144-12, 2013. doi:10.1128/genomeA.00144-12.

PEACOCKE, C.; JOSEPH, S. **Notes on terminology and technology in thermal conversion prepared for the International Biochar web site**. Disponível em: <http://www.biochar-international.org/images/Terminology.doc>. Acesso em: 11 jul. 2013.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.30, p.879–903, 2012.

PENG, R.; XIONG, A.; XUE, Y.; FU, X.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y.; YA, Q. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.32, p.927–955, 2008. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x.

PENG, X.; MASAI, E.; FUKUDA, M. Characterization of the meta-Cleavage Compound Hydrolase Gene Involved in Degradation of the Lignin-Related Biphenyl Structure by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 6, p. 2789-2793, 1999.

PERRIELLO, F. A. **Bioremediation of petroleum pollutants with alkane-utilizing bacteria**. US6110372, 2000. Disponível em: <http://www.google.com/patents/CA2367931A1?cl=en>.

PETERSEN, J.B.; NEVES, E.G.; WOODS, W.I. Tropical Forest Archaeology in Central Amazon: Landscape transformation and sociopolitical complexity. In: ANNUAL MEETING FOR THE SOCIETY FOR AMERICAN ARCHAEOLOGY, 70., 2005, Salt Lake City.

PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J.E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 23–35, 2009.

Petroleum.co.uk. **Petroleum composition**. Disponível em: <http://www.petroleum.co.uk/composition>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

PIEPER, D. H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p.170-191, 2005. doi: 10.1007/s00253-004-1810-4.

PIETIKAINEN, J.; KIIKKILA, O.; FRITZE, H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. **Oikos**, Copenhagen, v. 89, p. 231-242, 2000.

POIRIER, N.; DERENNE, S.; ROUZAUD, J.-N.; LARGEAU, C.; MARIOTTI, A.; BALESDENT, J.; MAQUET, J. Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France). **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 31, n. 9, p. 813-827, 2000.

REBELLATO, LILIAN. **Interpretando a variabilidade cerâmica e as assinaturas químicas e físicas do solo no Sítio Arqueológico Hatahara – AM**. 2007. Tese (Doutorado em Arqueologia)-Museu de Arqueologia e Etnologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 26p. (Documentos, 51).

ROHDE, G.M. O Mito da combustão espontânea do carvão. **Revista da Madeira**, Florianópolis, n. 106, jul. 2007. Disponível em: http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1112&subject=E%20mais&title=O%20mito%20da%20combust%20o%20espont%20nea%20do%20carv%20o%20veg etal.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.11, n.10, p. 2477–2490, 2009.

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 135-147, 1997.

RUEL, K.; NISHIYAMA, Y.; JOSELEAU, J. P. Crystalline and amorphous cellulose in the secondary walls of Arabidopsis. **Plant Science**, Amsterdam, v.193–194, p.48–61, 2012. doi:10.1016/j.plantsci.2012.05.008.

SARMA, P. M.; BHATTACHARYA, D.; KRISHNAN, S.; LAL, B. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, n.5, p.3163-6, 2004.

SATANOKA, S. **Hokkaido Daigaku**, Enshurin Hokoku, Hokkaido Daigaku, v. 22, n.2, p. 609-814, 1963.

SAYLER, G. S.; SHIELDS, M. S.; TEDFORD, E. T.; BREEN, A.; HOOPER, S. W.; SIROTKIN, K. M.; DAVIS, J. W. Application of DNA-DNA colony hybridization to the

detection of catabolic genotypes in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.49, p.1295-1303, 1985.

SCHMIDT, M.W.I.; NOACK, A.G. Black carbon in soils and sediments: analysis, distribution, implications, and current challenges. **Global Biochemical Cycles**, Washington, DC, v. 14, p. 777-793, 2000.

SCHNEIKER, S.; MARTINS DOS SANTOS, V.A.; BARTELS, D.; BEKEL, T.; BRECHT, M.; BUHRMESTER, J.; et al. Genomesequene of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. **Nature Biotechnology**, New York, v.24, p.997–1004, 2006.

SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C. J.; PIERSON, J. D.; FORMEY, L. J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.80, p. 365-380, 2008.

SHAH, H. N. The Genus *Bacteroides* and Related taxa. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 196, p.3593-3607.

SHANKLIN, J.; ACHIM, C.; SCHMIDT, H.; FOX, B. G.; MÜNCK, E. Mössbauer studies of alkane omega-hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v.94, n. 7, p.2981-2986, 1997.

SHANKLIN, J.; WHITTLE, E.; FOX, B. G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-coa desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. **Biochemistry**, Washington, DC, v.33, p.12787–12794, 1994.

SHAW, J. **Who killed the men of England?** In: Harvard Magazine. July-August, 2009. Disponível em: <http://harvardmag.com/pdf/2009/07-pdfs/0709-30.pdf>. Acesso em: 30 Jul 2014.

SHYU, C.; SOULE, T.; BENT, S.J.; FOSTER, J.A.; FORNEY, L. J. MiCA: A Web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 562–570, 2007.

SIMON, M. J.; OSSLUND, T. D.; SAUNDERS, R.; ENSLEY, B. D.; SUGGS, S.; HARCOURT, A.; SUEN, W. C.; CRUDEN, D. L.; GIBSON, D. T.; ZYLSTRA, G. J. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. **Gene**, Amsterdam, v.127, p.31-37, 1993.

SKJEMSTAD, J. O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J. A.; OADES, J. M.; MCCLURE, S. G. The chemistry and nature of protected carbon in soil. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.34, p.251–271, 1996.

SOHI, S. P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. A review of biochar and its use and function in soil. **Advances in Agronomy**, New York, v.105, p. 47-82, 2010. doi: 10.1016/S0065-2113(10)05002-9.

SOMBROEK, W.; RUIVO, M. L.; FEARNside, P. M.; GLASER, B.; LEHMANN, J. Amazonian dark earths as carbon store and sinks. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 125-139.

SOMBROEK, W. **Amazon soil: a reconnaissance of the soils of the Brazilian Amazon region**. Wageningen: Centre for Agricultural Publications and Documentation, 1966. 292p.

SOTSKY, J. B.; GREER, C. W.; ATLAS, R. M. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, n.11, p.981-985, 1991.

SOUZA, L. F.; MADARI, B.; BENITES, V. M.; CUNHA, T. J.; NEVES, E. G. **Relação entre a fertilidade e as substâncias húmicas numa terra preta da Amazônia**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

SPAIN, J. C.; VAN VELD, P. A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.54, p. 428-435, 1983. PMID: PMC242303.

STEINER, C.; DAS, K. C.; GARCIA, M.; FORSTER, B.; ZECH, W. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. **Pedobiologia**, Amsterdam, v.51, p.359-366, 2008. doi:10.1016/j.pedobi.2007.08.002.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reaction**. 2. ed. New York: Wiley, 1994.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **Methods in molecular biology: PCR Protocols**. 2.ed. Totowa: Humana Press, 2003. cap.13, p.53-54.

SUN, J. Q.; XU, L.; ZHANG, Z.; LI, Y.; TANG, Y. Q.; WU, X. L. Diverse bacteria isolated from microtherm oil-production water. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.105, n.2, p.401-11, 2014. doi: 10.1007/s10482-013-0088-x.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v.28, p.2731-2739, 2011.

TARA, N.; AFZAL, M.; ANSARI, T. M.; TAHSEEN, R.; IQBAL, S.; KHAN, Q. M. Combined use of alkane-degrading and plant growth-promoting bacteria enhanced phytoremediation of diesel contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, London, v.16, n. 7-12, p.1268-77, 2014.

TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. **As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas.** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 420 p. 1 CD-ROM.

TEIXEIRA, W. G.; MATINS, G. C. **Soil physical characterization.** In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). *Amazonian Dark Earths: Origin, properties, management.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.272-286.

The Epoch Times. **Behind a Strong GDP is China's Weaking Soil.** Disponível em: <http://www.theepochtimes.com/n2/china-news/behind-a-strong-gdp-is-chinas-weakening-soil-250884.html>. Acessado em: 10/03/2013.

THE ROYAL SOCIETY. **Sustainable biofuels: prospects and challenges.** Cardiff, UK: The Clyvedon Press, 2008.90 p. Disponível em: https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2008/7980.pdf.

THEO, H. M.; SMITS, T.H.M.; ROETHLISBERGER, M.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J.B. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.1, n. 4, p: 307-317, 1999.

THIES F. L.; KÖNIG W.; KÖNIG B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprint. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 56, p.755-61, 2007.

THIES, J.; RILLING, M. Characteristics of biochar: biological properties. In: LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). **Biochar for environmental management: science and technology.** London: Earthscan, 2009.

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.13, p.109-112, 1999.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Science**, Washington, DC, v. 221, p. 661-663, 1983.

TOH, H.; WEISS, B. L.; PERKIN, S. A.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; AKSOY, S. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. **Genome Research**, Woodbury, v. 16, p.149–156, 2006.

TROJANOWSKI, J.; HAIDER, K.; SUNDMAN, V. Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocardia* sp. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 114, p.149-153, 1977.

TSAI, S. M.; CANNAVAN, F. S.; SILVA JR., J. P.; CHAVES, M. G.; PASSIANOTO, C. C.; BORGES, C.P. Bacterial diversity in Terra Preta de Índio based on the 16S rRNA gene. In: BRAZILIAN CONGRESS ON SOIL SCIENCE, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

TSUZUKI, E.; WAKIYAMA, Y.; ETO, H.; HANDA, H. Effect of pyroligneous acid and mixture of charcoal with pyroligneous acid on the growth and yield of rice plant. **Japan Journal Crop Science**, Tokyo, v.58, n.4, p.592-597, 1989.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.72, p.169–183, 2000.

UDDIN, S.M.M.; MURAYAMA, S.; ISHIMINE, Y.; TSUZUKI, E.; HARADA, J. Effect of the mixture of charcoal with pyroligneous acid on dry matter production and root growth of summer planted sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Japan Journal Crop Science**, Tokyo, v.64, n.4, p.747-753, 1995.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME- UNEP. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments**. Monaco: Marine Environmental Studies Laboratory; IAEA Marine Environment Laboratory, 1992. (Reference Methods for Marine Pollution Studies, 20). Disponível em: <http://iwlearn.net/publications/regional-seas-reports/reference-methods-for-marine-pollution-studies-no.20>.

USDA. Natural Resources Conservation Service. **Keys to soil taxonomy**. 10. ed. Washington, DC: Soil Survey Staff, 2006. 332p. Disponível em: http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_052172.pdf.

USEPA **Priority pollutants**. Appendix A to Part 423—126. Washington, DC, 2013. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>. Acessado em: 19 nov. 2013.

VAN BEILEN, J. B.; SMITS, T. H.; ROOS, F. F.; BRUNNER, T.; BALADA, S.; RÖTHLISBERGER, M.; WITHOLT, B. Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.187, n.1, p.85-91, 2005.

VASCONCELLOS, R. L. F. **Actinobactérias da rizosfera de Araucaria angustifolia com potencial biotecnológico**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-18112008-150538/>. Acesso em: 2012-04-20.

VAZ-MOREIRA, I.; NOBRE, M. F.; FERREIRA, A. C.; SCHUMANN, P.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. *Humibacter albus* gen. nov., sp. nov., isolated from sewage sludge compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, n. 4, p.1014-1018, 2008. doi: 10.1099/ijs.0.65266-0.

VICUÑA, R. Bacteria degradation of lignin. Review. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v.10, p. 646-655, 1988.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

VIEIRA, L.S. **Manual da ciência do solo: com ênfase aos solos tropicais**. 2.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1988.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T.C. **Amazônia: seus solos e outros recursos naturais**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1987. 416 p.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; STERKENBURG, A.; VAN ANDEL, J. G. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.36, p. 548-552, 1992. doi: 10.1007/BF00170201.

WACKETT, L. P. Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 40, p. 41259-41262, 2004.

WAKSMAN, S. A. **Humus origin, chemical composition, and importance in nature**. The Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1936. 508 p.

WARDLE, D.A.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.C. The charcoal effect in Boreal forests: mechanisms and ecological consequences. **Oecologia**, Berlin, v. 115, p. 419-426, 1998.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.173, n.2, p. 697-703, 1991.

WENZL, H.F.J. **The chemical technology of wood**. New York, NY: Academic Press, 1970. 692p.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WITZIG, R.; JUNCA, H.; HECHT, J.; PIEPER, D. H. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, n.5, p. 3504–3514, 2006.

WOODS, W. I. Development of Anthrosol Research. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian Dark Earths: Origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.3-14.

WRIGHT, E.S.; YILMAZ, L. S.; NOGUERA, D. R.; DECIPHER: A search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.78, n.3, p.717-25, 2012. doi: 10.1128/AEM.06516-11.

YAKIMOV, M. M.; GOLYSHIN, P. N.; LANG, S.; MOORE, E. R.; ABRAHAM, W. R.; LUNSDORF, H.; TIMMIS, K. N. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a

new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.48, p. 339–348, 1998.

ZANETTI, M.; CAZETTA, J.O.; JÚNIOR, D.M.; CARVALHO, S. A. C. Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro ‘cravo’ em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 3, p. 508-512, 2003.

ZECH, W. L. Tropen – Lebensraum der Zukunft. **Geologische Rundschau**, Heidelberg, v. 49, p.11-17, 1997.

ZECH, W.; HAUMAIER, L.; HEMPFLING, R. Ecological aspects of soil organic matter in tropical land use. In: McCARTHY, P.; CLAPP, C.E.; MALCOLM, R.L.; BLOMM, P.R. (Ed.). **Humic substances in soil and crop sciences: selected readings**. Madison: ASA; SSSA, 1990. p.187-201.

ZHANG, Y.P.; LYND, L. R. Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.87, p. 99–106, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Identificação dos 86 isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano

Isolados	Banco de dados	Filos
27E_Arthrobacter_sp._JX010952.1(98%_1417bp)(Barroso/ES)	NCBI	Actinobacteria
30E_Burkholderia_caribensis_GU144372.1(98%_1435bp)(Barroso/ES)	NCBI	Firmicutes
4B_Bacillus_methylotrophicus_EU194897(99.23%_1441bp)(Barroso/BHI)	EZTaxon-e	Firmicutes
12B_Bacillus_pseudomyoides_ACMX01000133(99.45%_1447bp)(Barroso/BHI)	EZTaxon-e	Firmicutes
14B_Bacillus_cereus_KF831402.1(99%_1426bp)(Barroso/BHI)	NCBI	Firmicutes
6B_Lysinibacillus_xylanilyticus_FJ477040(99.11%_1444bp)(Barroso/BHI)	EZTaxon-e	Firmicutes
5B_Paenibacillus_sp._FJ932656.1(98%_1452bp)(Barroso/BHI)	NCBI	Firmicutes
23E_uncultured_Bacillus_FJ478878.1(99%_1443bp)(Barroso/ES)	NCBI	Firmicutes
22GA_Burkholderia_sp._KF922658.1(98%_962bp)(Barroso/GA)	NCBI	Proteobacteria
30A_uncultured_Pseudomonas_HM996802.1(98%_914bp)(Barroso/AIA)	NCBI	Proteobacteria
20A (C.Açutuba/AIA)	-	-
2A (C.Açutuba/ES)	-	-
2E (C.Açutuba/ES)	-	-
35T_Arthrobacter_woluwensis_X93353(97.49%_879bp)(C.Açutuba/TSA) alkB	EZTaxon-e	Actinobacteria
19GA_Achromobacter_sp._JN836430.1(99%_905bp)(C.Açutuba/GA)	NCBI	Proteobacteria
23B_Bacillus_subtilis_JN366715.1(99%_1444bp)(C.Açutuba/BHI)	NCBI	Firmicutes
32T_Acinetobacter_sp._KC257028.1(99%_893bp)(C.Açutuba/TSA) alkB	NCBI	Proteobacteria
21GA_Burkholderia_sp._JF772524.1(99%_902bp)(C.Açutuba/GA)	NCBI	Proteobacteria
33T_Burkholderia_cepacia_AY741362.1(99%_859bp)(C.Açutuba/TSA)	NCBI	Proteobacteria
8E_Burkholderia_stabilis_AF148554(99.37%_1431bp)(C.Açutuba/ES)	EZTaxon-e	Proteobacteria
5E_Enterobacter_ludwigii_KF475862.1(99%_1446bp)(C.Açutuba/ES)	NCBI	Proteobacteria
17GA_Enterobacter_ludwigii_KC139450.1(99%_882bp)(C.Açutuba/GA)	NCBI	Proteobacteria
3E_Pseudomonas_sp._AM088477.1(99%_1438bp)(C.Açutuba/ES) alk	NCBI	Proteobacteria
19A_Pseudomonas_nitroreducens_JF441245.1(99%_819bp) (C.Açutuba/AIA)	NCBI	Proteobacteria
1E_Pseudomonas_nitrireducens_HM246143(97.27%_1449bp)(C.Açutuba/ES)	EZTaxon-e	Proteobacteria
8GA_uncultured_Gammaproteobacteria_JN882128.1(92%_1453bp)(C.Açutuba/GA)	NCBI	Proteobacteria
51A_putative_Rhodococcus(86%_808bp)(H.Canavial/AIA)	RDP	Actinobacteria
40E_Streptomyces_tanashiensis_AJ781362(99.23%_1428bp)(H.Canavial/ES)	EZTaxon-e	Actinobacteria
3B_Bacillus_barbaricus_GQ284513.1(98%_1451bp)(H.Canavial/BHI)	NCBI	Firmicutes
35GA_Paenibacillus_glucanolyticus(98.37%_797bp)(H.Canavial/GA)	EZTaxon-e	Firmicutes
33E_Acinetobacter_oleivorans_CP002080(98.40%_1442bp)(H.Canavial/ES)	EZTaxon-e	Proteobacteria
37E_Burkholderia_sp._AB665358.1(98%_1431bp)(H.Canavial/ES)	NCBI	Proteobacteria
41E_Cupriavidus_necator_CP002878(99.44%_1435bp)(H.Canavial/ES)	EZTaxon-e	Proteobacteria
52A_Enterobacter_sp._JF970207.1(99%_843bp)(H.Canavial/AIA)	NCBI	Proteobacteria
33GA_Pantoea_anthophila_JN644500.1(96%_727bp)(H.Canavial/GA)	NCBI	Proteobacteria
30GA_Pseudomonas_plecoglossicida_JQ995478.1(99%_870bp)(H.Canavial/GA) alk	NCBI	Proteobacteria
31GA_Pseudomonas_koreensis_GQ368179.1(98%_1416bp)(H.Canavial/GA)	NCBI	Proteobacteria
37GA_Pseudomonas_sp._FR725962.1(99%_1446bp) (H.Canavial/GA)alk	NCBI	Proteobacteria
31E_uncultured_Variovorax_JQ770029.1(97%_808bp)(H.Canavial/ES)	NCBI	Proteobacteria
34GA_uncultured_Parapusiliimonas(676bp)(H.Canavial/GA)	RDP	Proteobacteria
44E_uncultured_Pseudomonas_HM996802.1(97%_897bp) (H.Canavial/ES)	NCBI	Proteobacteria
28GA_Achromobacter_sp._JN043371.1(99%_835bp) (H.Capoeira/GA)	NCBI	Proteobacteria
39A_Achromobacter_marplatensis_EU150134(99.25%_945bp)(H.Capoeira/AIA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
41A_Achromobacter_xylosoxidans_CP006958(97,19%_1421bp)(H.Capoeira/AIA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
11B_Arthrobacter_urefaciens_FN433020.1(98%_1427bp)(H.Capoeira/BHI)	NCBI	Actinobacteria
35A_uncultured_Pseudomonas_HM996802.1(99%_1444bp)(H.Capoeira/AIA)	NCBI	Proteobacteria
9B_uncultured_Pseudomonadaceae(100%_1441bp)(H.Capoeira/BHI)	RDP	Proteobacteria

Continuação. Identificação dos 86 isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano

Isolados	Banco de dados	Filos
62A <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> X80743(97.05%_901bp)(H.Pastagem/AIA)	EZTaxon-e	Actinobacteria
45E <i>Flavobacterium anhuiense</i> EU046269(95.59%_567bp)(H.Pastagem/ES)	EZTaxon-e	Bacteroidetes
27B <i>Bacillus</i> sp. KF206364.1(99%_698bp)(H.Pastagem/BHI)	NCBI	Firmicutes
29B <i>Bacillus thuringiensis</i> JF947357.1(99%_1453bp)(H.Pastagem/BHI)	NCBI	Firmicutes
31B <i>Bacillus anthracis</i> AB190217(99.54%_1440bp)(H.Pastagem/BHI)	EZTaxon-e	Firmicutes
46E <i>Bacillus anthracis</i> AB190217(99.62%_1445bp)(H.Pastagem/ES) alk	EZTaxon-e	Firmicutes
30B <i>Bacillus</i> sp. AB733540.1(99%_1460bp)(H.Pastagem/BHI)	NCBI	Firmicutes
3GA <i>Achromobacter aegriifaciens</i> HF586507(97.77%_949bp)(H.Pastagem/GA) alk	EZTaxon-e	Proteobacteria
6GA <i>Burkholderia ubonensis</i> EU024179(99.32%_916bp)(H.Pastagem/GA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
5GA <i>Enterobacter</i> sp. JF970207.1(99%_809bp)(H.Pastagem/GA)	NCBI	Proteobacteria
65A <i>Pseudomonas nitroreducens</i> AM088474(98.82%_933bp)(H.Pastagem/AIA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
47E putative <i>Bordetella</i> (88%_758bp)(H.Pastagem/ES)	RDP	Proteobacteria
1GA <i>Ralstonia mannitolilytica</i> KF751574.1(99%_871bp)(H.Pastagem/GA)	NCBI	Proteobacteria
2GA uncultured <i>Leclercia</i> EU850462.1(95%_1446bp)(H.Pastagem/GA)	NCBI	Proteobacteria
64A unclassified <i>Enterobacteriaceae</i> (100%_901bp)(H.Pastagem/AIA)	RDP	Proteobacteria
7GA uncultured <i>Alcaligenaceae</i> KC179063.1(93%_1408bp)(H.Pastagem/GA)	NCBI	Proteobacteria
28B uncultured bacteria FQ700280.1(82%_679bp)(H.Pastagem/BHI) alkB	NCBI	Un. bacteria
43A <i>Arthrobacter woluwensis</i> AB244289.1(98%_707bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Actinobacteria
69A <i>Arthrobacter siccitolerans</i> GU815139(98.05%_720bp)(Laguinho/AIA)	EZTaxon-e	Actinobacteria
80A <i>Arthrobacter</i> sp. FJ389669.1(99%_1421bp)(Laguinho/AIA)	NCBI	Actinobacteria
20B <i>Bacillus subtilis</i> JQ900635.1(99%_1469bp)(Laguinho/BHI)	NCBI	Firmicutes
10IE <i>Bacillus</i> sp. AB826002.1(99%_1446bp)(Laguinho/ES) alk	NCBI	Firmicutes
12GA uncultured <i>Gammaproteobacteria</i> sp. JF772106.1(98%_762bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Firmicutes
21B <i>Brevibacillus laterosporus</i> KF475847.1(97%_1389bp)(Laguinho/BHI)	NCBI	Firmicutes
40GA_1 <i>Burkholderia ubonensis</i> EU024179(99.65%_894bp)(Laguinho/GA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
16E <i>Enterobacter ludwigii</i> AJ853891(97.09%_1447bp)(Laguinho/ES)	EZTaxon-e	Proteobacteria
42GA <i>Leifsonia</i> sp. JN872512.1(99%_885bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Proteobacteria
38GA <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> AJ575816(96.22%_794bp)(Laguinho/GA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
43GA <i>Pseudomonas</i> sp.(100%_786bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Proteobacteria
44GA <i>Pseudomonas taiwanensis</i> EU103629(99.45%_909bp) (Laguinho/GA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
14GA <i>Pseudomonas</i> sp. HQ840775.1(98%_1433bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Proteobacteria
74A putative <i>Micrococcaceae</i> (95%_684bp)(Laguinho/AIA)	RDP	Proteobacteria
16LGA <i>Ralstonia mannitolilytica</i> KF150443.1(96%_1443bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Proteobacteria
41GA uncultured <i>Burkholderia</i> AB916411.1(98%_1429bp)(Laguinho/GA)	NCBI	Proteobacteria
70A uncultured <i>Pseudomonas</i> HM996802.1(99%_1446bp)(Laguinho/AIA)	NCBI	Proteobacteria
22E <i>Arthrobacter niigatensis</i> AB248526(98.3%_1416bp)(Lago Grande/ES)	EZTaxon-e	Actinobacteria
47GA <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> X80743(98.65%_900bp)(Lago Grande/GA)	EZTaxon-e	Actinobacteria
11A <i>Arthrobacter</i> sp. FJ389669.1(99%_840bp)(Lago Grande/AIA)	NCBI	Actinobacteria
1A uncultured <i>Micrococcineae</i> (100%_898bp)(Lago Grande/AIA)	RDP	Actinobacteria
7A <i>Bacillus aerophilus</i> AJ831844(98.09%_894bp)(Lago Grande/AIA)	EZTaxon-e	Firmicutes
9A <i>Paenibacillus</i> sp. JX434145.1(99%_814bp) (Lago Grande/AIA) alkM	NCBI	Firmicutes
3A uncultured <i>Rummeliibacillus</i> JN882109.1(88%_1448bp)(Lago Grande/AIA)	NCBI	Firmicutes
19E uncultured <i>Paenibacillus</i> JN245655.1(98%_1461bp)(Lago Grande/ES)	NCBI	Firmicutes
8A <i>Acinetobacter</i> sp. KC257028.1(97%_798bp)(Lago Grande/AIA) alkB	NCBI	Proteobacteria
45GA <i>Pantoea anthophila</i> EF688010(95.00%_841bp)(Lago Grande/GA)	EZTaxon-e	Proteobacteria
46GA <i>Pantoea anthophila</i> EF688010(98.33%_877bp)(Lago Grande/GA)	EZTaxon-e	Proteobacteria

Os isolados estão identificados quanto ao seu nome, sua identificação molecular, número de acesso; porcentagem de similaridade com a identificação e tamanho da sequência do gene 16S rRNA; área de coleta de onde provêm e meio de cultivo utilizado para seu isolamento. As linhas pontilhadas delimitam as áreas de coleta das quais os isolados são provenientes. Meios de cultivo: ES- Extrato de solo; AIA-Actinomycetes Isolation Agar; GA-Agar de isolamento de Wageningen; TSA-Trypticase Soy Agar; BHI- Brain-Heart Infusion Agar. Bancos de dados: NCBI-National Center for Biotechnology Information (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome); RDP-Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>); EZTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>).

ANEXO B - Identificação das *open reading frames* do gene *alk* dos 11 isolados

Isolados	ORF	Seq. (pb)	N. Acesso	Descrição	Sim.	E-value
35T_Arthrobacter _woluensis_X93 353(97.49%-879b p)(C.Açutuba/TSA) alkB		498	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	95%	7,00E-69
	+3	213	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
	-3	117	KCX34360.1	fatty acid desaturase family protein [Acinetobacter baumannii 263903-1]	97%	2e-113
	+3	117	WP_027679218.1	alkane 1-monooxygenase [Ralstonia sp. UNC404CL21Col]	98%	7e-126
32T_Acinetobacte r_sp_KC257028. 1(99%-893bp)(C. Açutuba/TSA) alkB		423	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	99%	2,00E-74
	+1	250	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
	+3	150	KCX34360.1	fatty acid desaturase family protein [Acinetobacter baumannii 263903-1]	97%	2e-113
	+3	142	WP_027679218.1	alkane 1-monooxygenase [Ralstonia sp. UNC404CL21Col]	98%	7e-126
	-2	117	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72
30GA_Pseudomo nas_plecoglossici a_JQ995478.1(99 %-870bp)(H.Cana vial/GA) alk		465	HQ685899.1	Acinetobacter radioresistens strain S13 alkane hydroxylase B gene, complete cds	99%	3,00E-87
	+1	132	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
	-1	111	WP_027679218.1	alkane 1-monooxygenase [Ralstonia sp. UNC404CL21Col]	98%	7e-126
	+2	105	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72
	+3	105	ABU48542.1	alkane-1 monooxygenase [Geobacillus stearothermophilus]	93%	8e-50
8A_Acinetobacter _sp_KC257028.1 (97%-798bp)(Lag o Grande/AIA) alkB		504	JX171313.1	Uncultured bacterium clone P1A03_GMR alkane- hydroxylase (alkB) gene, partial cds	89%	1,00E-68
	+2	444	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
	-2	200	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72
	-2	150	AFQ37259.1	alkane-hydroxylase [uncultured bacterium]	77%	1e-70
	+1	114	ABU48542.1	alkane-1 monooxygenase [Geobacillus stearothermophilus]	93%	2e-50
3E_Pseudomonas _sp_AM088477.1 (99%-1438bp)(C. Açutuba/ES) alk		543	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	99%	1,00E-123
	-3	499	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	7e-130
	+1	165	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72
16GA(Laguinho/ GA)alkB		541	JN616316.1	Bacillus sp. MS238f alkane-1-monooxygenase (alkB1) gene, partial cds	99%	7,00E-120
	-1	531	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
	+2	363	WP_027679218.1	alkane 1-monooxygenase [Ralstonia sp. UNC404CL21Col]	98%	7e-126
	-2	222	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72
	+3	219	ABU48542.1	alkane-1 monooxygenase [Geobacillus stearothermophilus]	93%	8e-50
2E (C.Açutuba/ES) alkB	+1	120	AFQ37259.1	alkane-hydroxylase [uncultured bacterium]	77%	1e-70
		523	EU307684.1	Uncultured bacterium clone OTU 19 alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	87%	1,00E-89
	-2	207	ABU48542.1	alkane-1 monooxygenase [Geobacillus stearothermophilus]	93%	2e-50
20A (C.Açutuba/AIA)a lkB	+3	186	AGI37810.1	alkane monooxygenase [Bavaricoccus sp. CY-31]	90%	3e-30
		549	JQ622394.1	Acinetobacter sp. SJ-15 alkane monooxygenase gene, partial cds	97%	2,00E-77
	-2	260	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
	+1	168	WP_027679218.1	alkane 1-monooxygenase [Ralstonia sp. UNC404CL21Col]	98%	7e-126
	+1	150	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72
	-3	132	ABU48542.1	alkane-1 monooxygenase [Geobacillus stearothermophilus]	93%	8e-50
	-3	111	AFQ37259.1	alkane-hydroxylase [uncultured bacterium]	77%	1e-70

Continuação. Identificação das *open reading frames* do gene *alk* dos 11 isolados

Isolados	ORF	Seq. (pb)	N. Acesso	Descrição	Sim.	E-value
9A_Paenibacillus_sp.		299	AJ009585.1	Acinetobacter sp. alkM gene, partial	93%	6,00E-40
JX434145.1(99%_81 4bp) (Lago Grande/AIA) alkM	+3	114	AGI37810.1	alkane monooxygenase [Bavariicoccus sp. CY-31]	90%	3e-30
28B_uncultured_bac teria_FQ700280.1(8 2%_679bp)(H.Pastag em/BHI) alkB		286	HG530430.1	Uncultured bacterium partial alkB gene for alkane monooxygenase, clone TGLR-4	95%	2,00E-36
	-3	105		Nenhuma significância		
		581	KF177290.1	Uncultured bacterium clone B4 putative alkane monooxygenase (alkB) gene, partial cds	93%	7,00E-118
2A	-2	260	ACB11546.1	alkane monooxygenase [uncultured bacterium]	98%	5e-126
(C.Açutuba/ES)alkB	+1	168	WP_027679218.1	alkane 1-monooxygenase [Ralstonia sp. UNC404CL21Col]	98%	9e-126
	+1	150	AFQ37260.1	alkane monooxygenase [uncultured organism]	97%	2e-72

Os isolados portadores de genes *alk* estão apresentados pelo nome do isolado, identificação molecular, número de acesso à sequência similar e porcentagem de similaridade com a identificação, seguido da área de coleta de onde provêm e o meio de cultivo pelo qual foi isolado. AIA - Actinomycetes Isolation Agar; BHI - Brain-Heart Infusion Agar; ES - Extrato de solo de TPA; GA- Agar de Wageningen; TSA- Trypticase Soy Agar. São ainda apresentados os tamanhos das sequências do gene *alk*, os números de acesso, porcentagem de similaridade e descrição das sequências similares. As ORFs foram identificadas no blastp do banco de dados NCBI. As sequências completas (detentoras de códons de parada) foram identificadas pelo método tblastx contra do banco de dados NCBI.